

***ESTRATEGIAS DE MUESTREO DE MICORRIZAS  
PARA ENCINAS Y AVELLANOS JÓVENES  
INOCULADOS CON *Tuber melanosporum* Vittad.***



**TPT Ingeniería Técnica Forestal – Explotaciones  
Forestales**

Autora: Lorena Palacio Martín

Tutor: Carlos Colinas González

Co-tutor: Antoni Olivera Ruestes

Diciembre 2008

## ÍNDICE

<b>1. Introducción .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>8</b>
<b>3. Material y Métodos .....</b>	<b>9</b>
<b>3.1. Localización del estudio y características del hábitat .....</b>	<b>9</b>
<b>3.2. Antecedentes culturales de la plantación .....</b>	<b>10</b>
<b>3.3. Diseño experimental.....</b>	<b>10</b>
<b>3.4. Toma de muestras .....</b>	<b>11</b>
<b>3.5. Época de muestreo y material utilizado .....</b>	<b>13</b>
<b>3.6. Identificación morfológica de las ectomicorrizas.....</b>	<b>14</b>
<b>3.7. Variables definidas .....</b>	<b>15</b>
<b>3.8. Tratamiento de datos.....</b>	<b>16</b>
<b>4. Resultados .....</b>	<b>19</b>
<b>4.1. Características generales .....</b>	<b>19</b>
<b>4.2. Distribución en avellanos .....</b>	<b>20</b>
Ápices tróficos totales .....	20
Micorrizas totales .....	21
Micorrizas de <i>T. melanosporum</i> .....	22
Ápices colonizados por hongos diferentes a <i>T. melanosporum</i> .....	23
Ápices sin micorrizas .....	24
Abundancia relativa de <i>T. melanosporum</i> .....	25
Abundancia relativa de ectomicorrizas .....	26
<b>4.3. Distribución en encinas.....</b>	<b>27</b>
Ápices tróficos totales .....	27
Micorrizas totales .....	28
Micorrizas de <i>T. melanosporum</i> .....	29
Ápices colonizados por hongos diferentes a <i>T. melanosporum</i> .....	30
Ápices sin micorrizas .....	31
Abundancia relativa de <i>T. melanosporum</i> .....	32
Abundancia relativa de ectomicorrizas .....	33
<b>4.4. Distribución conjunta en encinas y avellanos .....</b>	<b>34</b>
Abundancia relativa de <i>T. melanosporum</i> .....	34
Abundancia relativa de ectomicorrizas .....	35

<b>4.5. Correlaciones entre los distintos métodos de muestreo .....</b>	<b>36</b>
Caso del primer metro cuadrado alrededor de la planta huésped.....	36
Caso de los primeros cuatro metros cuadrados alrededor de la planta huésped .....	38
Caso de los 9 metros cuadrados totales alrededor de la planta huésped.....	41
<b>5. Discusión .....</b>	<b>46</b>
<b>5.1. La distribución de los ápices tróficos con y sin hongos alrededor del     árbol .....</b>	<b>46</b>
<b>5.2. Los métodos de muestreo.....</b>	<b>48</b>
Caso del muestreo en el primer metro cuadrado alrededor del árbol .....	49
Caso del muestreo en los primeros cuatro metros cuadrados alrededor del árbol.....	49
Caso del muestreo en los primeros nueve metros cuadrados alrededor del árbol.....	50
<b>6. Conclusiones .....</b>	<b>53</b>
<b>7. Bibliografía .....</b>	<b>55</b>

## 1. Introducción

Los hongos ectomicorrícicos forman asociaciones simbióticas con un amplio espectro de plantas, especialmente con las especies leñosas que habitan en la mayoría de los bosques de las zonas templada, boreal y mediterránea. Para describir las estructuras modificadas de los ápices radiculares causadas por los hongos se usa el nombre de micorriza, cuyo nombre fue acuñado por A.B. Frank en 1885 (Frank, 2005).

Típicamente, los hongos ectomicorrícicos forman un manto miceliar alrededor del ápice radicular. El micelio penetra a través de las uniones entre las células corticales y epidérmicas envolviéndolas con una forma altamente estructurada conocida como la red de Hartig (Brundrett *et al.*, 1996). Esta red representa el punto de contacto entre la planta huésped y el hongo, y es el punto crítico para el mutualismo ya que es por donde se realiza la transferencia de nutrientes y carbono entre los dos socios (Smith y Read, 1997). Del manto emanan hacia el suelo un conjunto de células especializadas que se conocen como cistidios o espínulas (Reyna, 2007). Además, el manto también está conectado con el micelio extra-radicular más o menos desarrollado, que se extiende desde la raíz hacia el suelo. Dicho micelio puede llegar a formar una fracción significativa de la biomasa total del suelo, tanto que en los bosques templados se ha estimado una cantidad de 700 a 900 kg/ha de micelio y raíces micorrizadas (Wallander *et al.*, 2001).

Las trufas son el cuerpo de fructificación de un conjunto de especies de hongos ectomicorrícicos que se engloban dentro del género *Tuber*. Conocidas también como las trufas verdaderas, para diferenciarlas de las trufas del desierto, que a pesar de que ambas comparten la clase de los Ascomicetes, no pertenecen al género *Tuber* (Kirk *et al.*, 2001). El género *Tuber* es uno de los pocos Ascomicetes ectomicorrícicos, que si bien en los sistemas de clasificación tradicional estaban incluidos en el orden de los Tuberales, actualmente, junto con todos los Ascomicetes hipogeos, se agrupan en el orden de los Pezizales. Así



pues, los Pezizales engloban los hongos hipogeos y epígeos, tanto si son saprófitos como simbióticos (Percudani *et al.*, 1999).

El cuerpo de fructificación de *T. melanosporum* se conoce como trufa negra. Esta fructificación es de tipo hipogea, esto es, produce las esporas en carpóforos subterráneos. Esta característica hace que el hongo sea más resistente ante heladas o sequías, pero también lleva a que carezca de mecanismos propios de dispersión de esporas. Por esto desarrolla un olor característico que atrae a determinados animales, y que son factores fundamentales en la dispersión de las esporas (De Miguel, 2000). La trufa negra se caracteriza principalmente por un peridio o pared de color negro brillante, y gleba blanquecina en su estado inmaduro, que se va oscureciendo con el tiempo, recorrida por unas venas extremadamente finas de color blanco, que van desapareciendo con la madurez. Posee forma globosa, algo irregular, con un tamaño que varía en función de las características climáticas del año y la época de recolección. Las ascas son globosas, en cuyo interior encierran de una a cuatro esporas opacas, de color marrón y con ornamentación (Estrada, 1987) .

En los últimos años la superficie de nuevas plantaciones para la producción de trufa negra ha experimentado un crecimiento notable, a un ritmo de 50.000 plantas anuales (Reyna, 2007). Este incremento ha sido propiciado por varios factores:

- 1) El elevado precio de la trufa negra en el mercado. En el año 2005-2006, el precio medio de un kilogramo de trufa negra en España fue de 380 € (Reyna, 2007).

- 2) La disminución de la producción silvestre, al mismo tiempo que la demanda ha ido en aumento. Esta disminución es debida al progresivo abandono que llevan sufriendo los montes durante los últimos años, con el consiguiente aumento de la espesura, que hace más difícil la supervivencia del hongo, además de la recolección excesiva de trufa, que impide la correcta dispersión de las esporas (Reyna, 2007).

3) Una abundante oferta de plantones inoculados con el hongo productor de la trufa negra.

4) La divulgación y apoyo hacia este cultivo por parte de las asociaciones de truficultores y la Administración.

La producción de una plantación trufera suele oscilar entre los 10 y 50 kg/ha y año, con unos beneficios estimados aproximadamente en 2.697 €/ha/año (Oliach *et al.*, 2008) . Por esto, las plantaciones de trufa han llegado a ser una alternativa rentable en aquellas zonas aptas para su cultivo, logrando convertirse en una actividad complementaria a los cultivos agrícolas tradicionales, o sustituyéndolos en ocasiones.

En general, las especies de plantas huésped utilizadas en las plantaciones representan una pequeña parte del conjunto de plantas que pueden formar simbiosis con el hongo productor de la trufa negra (*Tuber melanosporum* Vittad.). Son reconocidos simbiontes de *T. melanosporum* encinas (*Quercus ilex* L. spp. *ilex*, *Q. ilex* L. spp. *ballota* (Desf.) Samp.), robles (*Q. Faginea* Lam., *Q. pubescens* Mill.), coscojas (*Q. coccifera* L.), avellanos (*Corylus avellana*), jaras (*Cistus incanus*), pinos (*Pinus pinea* L., *P. halepensis* Mill., *P. nigra* Arnold), carpes negros (*Ostrya carpinifolia* Scop.), carpes o carpinos (*Carpinus betulus* L.), y tilos (*Tilia* sp.); según la revisión efectuada en Colinas *et al.* (2007). De todos éstos, los huéspedes más habituales comercialmente son las encinas, robles, coscojas y avellanos.

La fase de pre-producción, en la cual el hongo coloniza los nuevos ápices del árbol y se expande alrededor la planta, varía entre los 5 y 8 años, en ocasiones incluso más (De Miguel y Saez, 1997 ). A pesar de la variabilidad de esta fase, hay árboles que no llegan a producir trufa negra. Las causas por las que el hongo necesita más o menos tiempo para alcanzar la fase productiva no son claras, aunque existe un acuerdo general en que los antecedentes culturales, las condiciones edafológicas y climáticas, y el manejo de la plantación son factores claves para la precocidad productiva. Para las situaciones en las que

las plantas inoculadas no llegan a producir, se pueden distinguir tres componentes principales:

1) Cuando anteriormente a la plantación, las plantas inoculadas presentaron una escasa o ninguna presencia de *T. melanosporum*. La evaluación de la planta inoculada para plantar en campo puede llevarse a cabo siguiendo diferentes metodologías, descritas cada una de ellas por Reyna (2007) .

2) Cuando las plantas inoculadas, aún presentando una presencia aceptable de *T. melanosporum* en sus raíces, fueron establecidas en parcelas con condiciones para el cultivo de la trufa muy alejadas de las adecuadas, limitando el desarrollo del hongo. Estos rangos de aptitud se establecen basándose en la observación de lugares donde la trufa se desarrolla de manera natural. Los bosques truferos en España se encuentran normalmente entre los 600 y los 1200 metros de altitud, con exposición sur que va cambiando a norte a medida que nos desplazamos hacia el sur, pendientes suaves, y precipitaciones comprendidas entre 485 y 1500 mm/año. Los suelos son calcáreos y pedregosos, con una profundidad entre los 10 y 40 cm. El pH oscila entre 7,5 y 8,5, la textura es equilibrada tipo franco, y estructura granular, que permite la aireación del suelo, circulación del agua por los poros, y penetración de las raíces de la planta y del micelio del hongo (Oliach *et al.*, 2008).

3) Aquellas situaciones en las que a pesar de observar una buena expansión del hongo productor de la trufa negra, éste no entra en producción. Un buen indicador del correcto desarrollo del hongo es la aparición del quemado alrededor del árbol entre el cuarto y el séptimo año de la plantación (Colinas *et al.*, 2007). Estos quemados son zonas desprovistas de vegetación debido al efecto antibiótico o fitotóxico que tiene el micelio de la trufa, y que inhibe la germinación de otras especies (Bonfante, 1971; Estrada, 1987). Hay pocas plantas capaces de sobrevivir en esta zona, son especies muy resistentes, propias de zonas pedregosas, entre otras el *Sedum* sp. y las *Euphorbia* sp.

(Reyna, 2007). El quemado tiene una forma más o menos circular alrededor del tronco, con un crecimiento aproximado hacia el exterior de entre 10 y 20 cm anuales. Bajo éste, las raíces micorrizadas suelen encontrarse a profundidades de 5 a 10 cm (García-Montero *et al.*, 2007). Según el mismo autor, el tamaño del quemado afecta de forma positiva en la producción de trufas, siendo los más grandes los de los árboles que más producen. Pero la aparición del quemado no siempre implica la producción de trufa negra, y su ausencia la no-producción. Hay árboles que producen trufa sin mostrar signos de quemado (frecuente en suelos arenosos), mientras que otros que sí tienen quemado no producen. Además, existen otras especies de hongos micorrícicos que producen quemados, aunque no tan desprovistos de vegetación. A pesar de esto, lo más frecuente es que se den trufas en las zonas de quemado.

Cada nuevo ápice trófico que se forma en las raíces de la planta huésped proporciona nuevas oportunidades para su infección y la formación de nuevas micorrizas. Dicha infección dependerá del inóculo presente en su entorno y de la velocidad de formación de micorrizas del hongo colonizador en las condiciones ambientales en que se encuentra (Allen *et al.*, 2003). En general, en las plantaciones, *T. melanosporum* convive con otros hongos ectomicorrícicos con los que compite por los recursos procedentes del árbol al que colonizan. La particularidad de este hongo es que con la formación de quemados, elimina los competidores del árbol huésped, dotándole así de mayor resistencia ante la sequía y la falta de nutrientes (Colinas *et al.*, 2007). Además, esta capacidad antibiótica afecta también a los microorganismos del suelo, no eliminándolos, pero sí aminorando su velocidad de crecimiento y desarrollo (Reyna, 2007).

Existe una importante variación en la morfología de las ectomicorrizas según la planta huésped y el hongo que las forma. Generalmente para identificar al hongo se usa el análisis de las características macroscópicas y microscópicas de las ectomicorrizas (Agerer, 1986). Así pues, mediante la extracción de micorrizas y su posterior

identificación se puede estimar la dominancia de una especie respecto al resto. El grado de dominancia que es necesario para que el ciclo de vida de *T. melanosporum* no se vea afectado no ha sido estudiado en profundidad, aunque algunos datos observacionales citan que una presencia de *T. melanosporum* de aproximadamente el 10% respecto al total de ápices, sería suficiente para producir trufa negra (Hernández *et al.*, 2001) . La competencia interespecífica está estrechamente ligada a las condiciones ambientales donde los hongos crecen, aunque para *T. melanosporum* sólo se ha observado en condiciones extremas (Mamoun y Olivier, 1990). Frecuentemente, la dominancia dentro de una comunidad de hongos ectomicorrícicos ha sido estimada a partir de la frecuencia y abundancia. La frecuencia simplemente hace referencia a la proporción de muestras que contienen micorrizas de una determinada especie, mientras que la abundancia ha sido referida como el porcentaje de micorrizas de una especie respecto al total de micorrizas de hongos ectomicorrícicos observados (Horton y Bruns, 2001).

Durante el período comprendido entre la plantación y la entrada en producción, es necesario conocer el estado de desarrollo de *T. melanosporum*. Si la evolución del hongo es favorable se podrán esperar futuros beneficios, o si por el contrario su desarrollo se ha estacionado, aún se puede estar a tiempo de intentar remediar, si es posible, la situación. Por esto, es necesario hacer un seguimiento del estado del sistema hongo-planta huésped durante el período no productivo de la plantación.

En plantaciones jóvenes, de menos de tres o cuatro años, y en árboles de crecimiento lento como la encina, es posible extraer la totalidad de las raíces y evaluar la presencia de micorrizas (Bonet *et al.*, 2006). Esta metodología, a pesar de dar una precisa caracterización de la comunidad de hongos ectomicorrícicos, es una técnica totalmente destructiva que no permite el estudio en el tiempo y representa un enorme esfuerzo, tanto económico como de tiempo. Por esto se llevan a cabo otras metodologías que se basan en la toma de muestras de

parte de las raíces finas del árbol, considerándose representativas de todo el sistema radicular de ese ejemplar.

Según la bibliografía, son tres los métodos más empleados en este tipo de muestreos parciales. Giraud (1988) propone con su “método de los sectores” tomar las raíces finas que se encuentran en varios hoyos de 15 a 20 cm de diámetro, realizados a distintas distancias sobre dos perpendiculares con centro en el tronco del árbol. Domínguez Nuñez *et al.* (2006) toma muestras de suelo en forma de cubos de 25x25x25 cm<sup>3</sup>. Otros, como Wallander *et al.* (2001) o el mismo Domínguez Nuñez *et al.* (2005), utilizan tubos de diferente diámetro y longitud (de 4 a 16 cm, y de 10 a 30 cm respectivamente), que introducen en el suelo para extraer las raíces. Las distancias a las que se aplica el método no están establecidas, aunque éste último utiliza una distancia al tronco semejante a la proyección de la copa. El último método al que se hace referencia consiste en seguir raíces desde el tronco hasta su fin (Kaldorf *et al.*, 2004).

La percepción que se obtiene de la diversidad en la comunidad de hongos ectomicorrícicos está ligada al método de muestreo que se utiliza, ya que generalmente las especies no se distribuyen al azar. En una distribución uniforme de los hongos ectomicorrícicos en la superficie del suelo, la abundancia de una especie seguiría una distribución de Poisson y la probabilidad de detección de una especie sería función de la abundancia relativa en que se encuentra. Así pues, para un esfuerzo de muestreo determinado podríamos establecer el límite de detección de una especie (Taylor, 2002). La realidad es bien diferente, y si algo define a las especies ectomicorrícicas es la heterogeneidad, tanto espacial como temporal, de manera que los taxones dominantes pueden presentar agregaciones a escalas inferiores de 3 metros (Lilleskov *et al.*, 2004) con lo que muchas especies pueden verse reemplazadas a escalas de 50 cm (Terdersoo *et al.*, 2003).

## **2. Objetivos**

Hasta el momento no se dispone de estudios que contemplen la comparativa entre el muestreo de micorrizas de *T. melanosporum* y la población total por planta huésped. En este trabajo se estudia la distribución espacial absoluta y relativa de los ápices que forman el sistema radicular de dos plantas huéspedes de *T. melanosporum*: encinas y avellanos; y se investiga la representabilidad de tres diferentes sistemas de muestreo en vista a la presencia de *T. melanosporum* y al resto de hongos ectomicorrícicos existentes en las raíces.

### **3. Material y Métodos**

#### **3.1. Localización del estudio y características del hábitat**

La parcela de estudio está situada en el término municipal de Prades, comarca del Baix Camp (Tarragona). Las coordenadas UTM son uso 31T, X: 0331314, Y: E4574012, con una altitud de 945 metros sobre el nivel del mar.

El sustrato geológico está formado mayoritariamente por pizarras paleozoicas, aunque también se encuentran areniscas pizarrosas y conglomerados. El conjunto es impermeable (Lledó y Piñol, 1989).

El clima en este municipio es típicamente mediterráneo, con veranos calurosos y secos, e inviernos relativamente suaves. Las precipitaciones medias se encuentran en torno a los 600 mm anuales, con valores comprendidos entre 280 y 905 mm, y máximos en primavera y en otoño. La temperatura media es de 13,6°C, con máximas absolutas registradas de 38°C y mínimas de -8°C. Las heladas son frecuentes de noviembre hasta abril. La insolación oscila entre un promedio de 4,8 horas de sol diarias en el mes de diciembre, a 10,8 horas en julio (Domingo y Borau, 1998; Lledó y Piñol, 1989).

La vegetación que rodea a la parcela de estudio está formada por cultivos tradicionales de avellano y nuevos cultivos de reciente introducción como el nogal (*Juglans regia* L.); y por el bosque típico de encinar montano, en el que predominan *Q. ilex* L. ssp. *ilex*, y *Pinus sylvestris* L. (Domingo *et al.*, 1998).

La textura del suelo es franca. El resto de propiedades químicas del mismo aparecen en la Tabla 1.



**Tabla 1. Propiedades edáficas de la parcela estudiada.**

Parámetro	Valor
pH al agua susp. 1:2.5	8,23
Cond. Elec. A 25°C ex.1:5 (dS/m)	0,155
Materia orgánica oxidable (%)	2,56
Carbonatos totales %	17,46
Caliza activa (o/oo)	27
Fósforo (P) Ass. (Olsen) (ppm)	19
Potasio (K) (Ex. Ace. Amo.) (ppm)	260
Arena gruesa (0.5-2 mm) (%)	5,2
Arena fina (0.05-0.5 mm) (%)	22,08
Limo grueso (0.02-0.05 mm) (%)	20,42
Limo fino (0.002-0.02 mm) (%)	27,94
Arcilla (Menor de 0.002) (%)	24,36
Suma de cationes	34,52
Capacidad de Intercambio Cationico	14,9
Clase textural USDA	FRANCA

### **3.2. Antecedentes culturales de la plantación**

Durante varios años la parcela estuvo dedicada a la producción forrajera y de cereal, con algunos años de barbecho. En la primavera del 2001, después de un subsolado profundo y varios pases de cultivador se plantaron encinas, robles y avellanos inoculados con *T. melanosporum*. Los plantones inoculados procedían de viveros comerciales. El estado de colonización de las raíces por parte de *T. melanosporum* se encontraba entre el 34% y el 53% (Datos facilitados por el servicio de evaluación de planta del Área de Defensa del Bosque-CTFC).

### **3.3. Diseño experimental**

Se muestrearon un total de seis árboles, tres encinas y tres avellanos, sobre los cuales se presenta un diseño experimental que contempla dos factores jerarquizados. El factor principal comprende el área de 9 m<sup>2</sup> en cuyo centro se encuentra la especie huésped de *T. melanosporum*: *Q. Ilex* y *C. avellana*. El factor jerarquizado atiende al sistema de muestreo: extracción de raíces secundarias, extracción de suelo mediante un cilindro, y extracción de raíces que se encuentran dentro de un poliedro.

Cada sistema formado por un árbol y el área de alrededor, de 9 m<sup>2</sup>, se consideró una unidad experimental para el factor principal. La muestra compuesta de las diferentes submuestras para cada sistema de muestreo se consideró la unidad experimental del factor jerarquizado.

### **3.4. Toma de muestras**

Como se ha dicho antes, son tres los métodos de muestreo que se comparan con el total. Dos de ellos, la extracción de raíces secundarias y la extracción de suelo mediante un cilindro, se llevaron a cabo antes de extraer el sistema radicular completo. El tercero, el método de los poliedros, forma parte de la extracción total, ya que ésta se hizo mediante un número de 36 submuestras del poliedro, que ocupaban los 9 m<sup>2</sup> que se muestrearon.

La extracción de las raíces secundarias se llevó a cabo con la ayuda de un cuchillo. Se empezó con un punto al azar cerca del tronco, y una vez localizada la raíz, se siguió hasta su fin, o en su defecto, alcanzar una profundidad máxima de 20 cm. Junto con la raíz secundaria también se extrajeron todas las ramificaciones que partían de ésta. Este proceso se repitió hasta obtener cinco raíces secundarias en cada árbol.



Fotografías 1 y 2. Extracción de raíces secundarias.

La extracción mediante el cilindro se realizó tomando ocho muestras en los vértices y puntos medios de un cuadrado de 1,5 x 1,5 m centrado en el tronco del árbol. Para marcar estos puntos se utilizó una malla en la que previamente se habían marcado las distancias, y que tomaba

como referencia el tronco. Tras esto, se tomaron otras 4 muestras junto al tronco, formando una cruz alrededor de éste. En la obtención de cada una de las submuestras, se empleó una maza para golpear el cilindro de modo que este alcanzase una profundidad de 15 cm. Previamente, con una azada, se limpiaron y retiraron los 5 primeros cm de suelo para eliminar la vegetación herbácea existente, en la que no había presencia de raíces de las plantas huéspedes. Con esto, la profundidad total alcanzada fue de 20 cm, y el volumen de cada una de las muestras de aproximadamente 680 cm<sup>3</sup>.

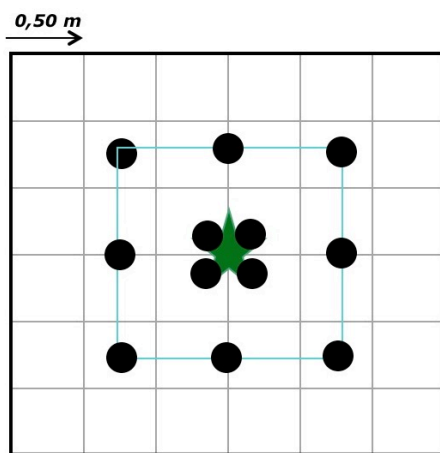


Figura 1. Distribución de los cilindros.



Fotografía 3. Extracción de suelo mediante cilindro.

Para llevar a cabo el método de muestreo de los poliedros y la extracción de todo el sistema radicular del árbol huésped, se marcaron en el suelo cuadros de 0,50 x 0,50 m sobre los 9 m<sup>2</sup> totales que se muestrearon. Para esto, se colocó una malla en la que previamente se habían marcado las distancias, y se dividió la superficie en un total de 36 cuadrados. Se tomó una profundidad de 40 cm, con lo que el volumen de cada poliedro fue de 0,1 m<sup>3</sup>. Se extrajeron las raíces encontradas en cada uno de los poliedros, y se guardaron individualmente con una parte de suelo para mantener la humedad. Las extracciones se realizaron con la ayuda de una pequeña retroexcavadora.



Fotografía 4: Malla con cuadros de 0,50 m.



Fotografía 5: Extracción de poliedros.



Fotografía 6: Extracción de poliedros.



Fotografía 7: Volumen de suelo muestreado.

### **3.5. Época de muestreo y material utilizado**

La toma de muestras se realizó durante los meses de Mayo y Junio de 2008. Se eligió este periodo de tiempo debido a que varios autores han señalado que la mejor fecha de recogida de micorrizas es en otoño y primavera (Giraud, 1983), en los meses de abril, mayo y noviembre (Bonet *et al.*, 2001). En este caso se extendió también al mes de junio al ser un año de lluvias muy tardías.

Todas las muestras obtenidas se guardaron en bolsas de plástico independientes y debidamente identificadas. Se conservaron en frío en campo, y una vez en el laboratorio, se mantuvieron en la cámara frigorífica a una temperatura de 4 °C hasta su posterior análisis.

El material utilizado durante la fase de campo fue:

- Cilindro metálico
- Maza
- Pico
- Malla
- Spray
- Varillas
- Bolsas de plástico
- Etiquetas
- Cuchillo
- Retroexcavadora

Una vez en el laboratorio, se utilizó:

- Cámara frigorífica a 4 °C
- Lupa binocular (50x), modelo WILD Z8
- Microscopio (100x – 1000x), modelo LEICA DMLB
- Aparato de limpieza por ultrasonidos, modelo J.P. SELECTA (A:0,4; V:230; W:140; Hz:50)
- Hidróxido de potasio (KOH)
- Agua destilada
- Detergente

### ***3.6. Identificación morfológica de las ectomicorrizas***

Para la identificación de ectomicorrizas de los árboles truferos, se observan las características morfológicas de estructuras como son: el manto, con disposición y forma determinada de las hifas, u otras estructuras fúngicas que pueden emanar del mismo (hifas, cistidios, rizomorfos) (De Miguel y Sáez, 2005). A partir de aquí, ya se puede

hacer una identificación de las micorrizas, si bien a veces es necesaria una observación al microscopio para corroborarlo. Esto se debe a que las micorrizas de una misma especie de hongo simbionte pueden variar en cuanto al tamaño, color y diámetros, en función del árbol y la época de recolección (De Miguel y Sáez, 1997).

Ya en laboratorio, con el fin de llevar a cabo la identificación y el conteo de micorrizas, se extendió el contenido de cada bolsa en una bandeja, se seleccionaron las raíces y se cortaron en trozos de 3 a 5 cm de longitud. Se pusieron dentro de un recipiente con agua y una pequeña cantidad de detergente, y éste se colocó en el aparato de limpieza por ultrasonidos durante aproximadamente 5 minutos. Posteriormente, cada uno de estos trozos se colocó en una placa de Petri, donde se analizaron bajo la lupa binocular.

En caso de duda en la identificación mediante lupa, se hizo una preparación al microscopio: se colocó el ápice en cuestión sobre un portaobjetos en el que previamente se había añadido KOH, y se cubrió con un cubreobjetos. Se hizo una ligera presión sobre la raíz y se observó con varios aumentos.

Se clasificaron los ápices analizados en: ápices sin micorrizas, ápices colonizados por *T. melanosporum*, y ápices con micorrizas de otros hongos diferentes a *T. melanosporum*. La identificación de las micorrizas de *T. melanosporum* se llevó a cabo basándose en las descripciones e ilustraciones que aparecen en el *Colour Atlas of Ectomycorrhizae* (Agerer, 2002).

### **3.7. Variables definidas**

Las variables que se han definido a lo largo del estudio son las siguientes:

- Micorrizas de *T. melanosporum*. Representa la suma de todas las micorrizas observadas por unidad experimental.



- Ápices sin micorrizas. Indica el número de ápices tróficos por unidad experimental en los que no se observó la formación de micorrizas.
- Ápices colonizados por hongos diferentes a *T. melanosporum*. Representa el número de ápices colonizados por hongos ectomicorrícicos distintos a *T. melanosporum* por unidad experimental.
- Ápices tróficos totales. Se refiere al total de ápices tróficos por unidad experimental, bien sean con o sin micorrizas.
- Micorrizas totales. Indica el número de ápices por unidad experimental que presentan micorrizas, tanto por *T. melanosporum* como por cualquier otro hongo diferente a éste.

A partir de estas variables, se han obtenido una serie de relaciones entre ellas:

- Abundancia relativa de *T. melanosporum*. Se calcula como el porcentaje de ápices colonizados por *T. melanosporum* respecto al total de los ápices que contienen micorrizas, y se refiere a la unidad experimental.
- Abundancia relativa de ectomicorrizas. Representa el porcentaje de ápices con micorrizas respecto al número total de los ápices tróficos, refiriéndose a la unidad experimental.

### **3.8. Tratamiento de datos**

Las distribuciones de las diferentes variables se han analizado en función de la especie, y para ambas en el caso de las abundancias relativas. No se analizan conjuntamente distribuciones de las dos especies en variables absolutas ya que el tipo de sistema radicular de cada una de ellas hace que el número de ápices de la encina resulten insignificantes frente a los del avellano. Para hacer las correlaciones entre métodos de muestro se emplean abundancias relativas, pues son las únicas variables que se pueden comparar.

Al describir las distribuciones espaciales, se considera como unidad

experimental cada uno de los poliedros, por lo que se haya la media de los resultados obtenidos en cada uno de ellos, en los árboles de la misma especie. Por tanto, en la representación gráfica aparecen valores medios acompañados de un código de color que hace referencia a los cuatro rangos en que se han dividido los datos de que se disponen, exceptuando aquellos que tienen como valor el 0.

En las abundancias relativas, se sigue el criterio de que si no se encuentran ápices de la variable que forma el denominador, se cuenta como poliedro sin datos; y si se encuentran ápices en el denominador, pero no en el numerador, el valor es 0. Las medias únicamente se calculan con los poliedros que presentan datos, esto es, presencia de ápices.

Las correlaciones entre las muestras obtenidas para cada sistema de muestreo y la población total se calcularon considerando el sistema árbol-superficie como la unidad experimental. Así pues, las variables relativas se obtienen mediante la suma de la variable numerador, y la suma de la variable denominador, ambas para cada unidad experimental, y su posterior cociente multiplicado por 100.

Los datos se trataron mediante el uso de hojas de cálculo (Microsoft Office, 2004). Las correlaciones entre variables se obtuvieron mediante el programa SPSS 10.0 (SPSS Inc. Chicago, IL, EEUU).

El test de la t de Student utilizado para establecer si la significancia de la correlación es diferente de cero se basa en el supuesto que los datos proceden de una distribución normal. Este no fue el caso, y por lo tanto, se prefirió utilizar un test de correlación no paramétrico como el coeficiente de correlación rho de Spearman (Campbell *et al.*, 2007).

El coeficiente rho se obtiene mediante la expresión:

$$\rho = 1 - \frac{6 \sum d_i^2}{n(n^2 - 1)}$$

Donde:  $d$  es la diferencia entre los correspondientes valores de cada



variable que se quiere conocer su correlación, y  $n$  es el número de parejas.

También se presenta el coeficiente de variación de cada método de muestro, cuya fórmula es:

$$C_V = \frac{\sigma}{\bar{x}} \cdot 100$$

Donde:  $\sigma$  es la desviación típica, y  $x$  es la media

## 4. Resultados

### 4.1. Características generales

En la Tabla 2 se muestran los ápices encontrados de las diferentes variables estudiadas en cada uno de los árboles, así como el total de ápices tróficos de cada árbol. Vemos que dentro de los avellanos hay mucha variabilidad en cuanto a cantidad de ápices, desde 63.525 en el avellano 2, hasta los 162.042 del avellano 3. En las encinas, este valor es más uniforme, rondando los 3.500 ápices por árbol.

Destacan las encinas 2 y 3 por no tener ningún ápice colonizado por *T. melanosporum*. Es interesante el bajo valor que toman los ápices colonizados por otros hongos diferentes a *T. melanosporum* en la única encina en la que se ha detectado la presencia de este hongo, tan sólo 54. También es bajo este valor en el avellano 2 en relación a la cantidad de ápices colonizados por *T. melanosporum*: solamente 300 ápices frente a casi 15.600.

Tabla 2. Número de ápices de los árboles muestreados para cada una de las variables y totales.

Árbol	Nº DE ÁPICES			Total
	<i>T. melanosporum</i>	Otras micorrizas	Sin micorrizas	
Avellano 1	18.220	5.299	47.355	<b>70.876</b>
Avellano 2	15.590	300	47.635	<b>63.525</b>
Avellano 3	27.090	10.861	124.091	<b>162.042</b>
Encina 1	667	54	2.659	<b>3.380</b>
Encina 2	0	1.163	2.676	<b>3.839</b>
Encina 3	0	614	2.680	<b>3.294</b>
				<b>306.956</b>

## 4.2. Distribución en avellanos

### Ápices tróficos totales

En la Figura 2 se muestra la representación gráfica de cómo se distribuyen los ápices tróficos en el avellano. Los valores que se dan son medias para cada cuadrante (de superficie 0,50 x 0,50 m) de los resultados obtenidos en los tres árboles de la misma especie.

Se observa que la cantidad de ápices es elevada, con una distribución que abarca todo el espacio muestreado, encontrando 33.965 ápices dentro de los cuatro primeros cuadrantes, 39.123 en los doce siguientes, y 25.726 en los 20 últimos. Se observa una tendencia nordeste, sobre la que se toman valores más altos que en el resto.

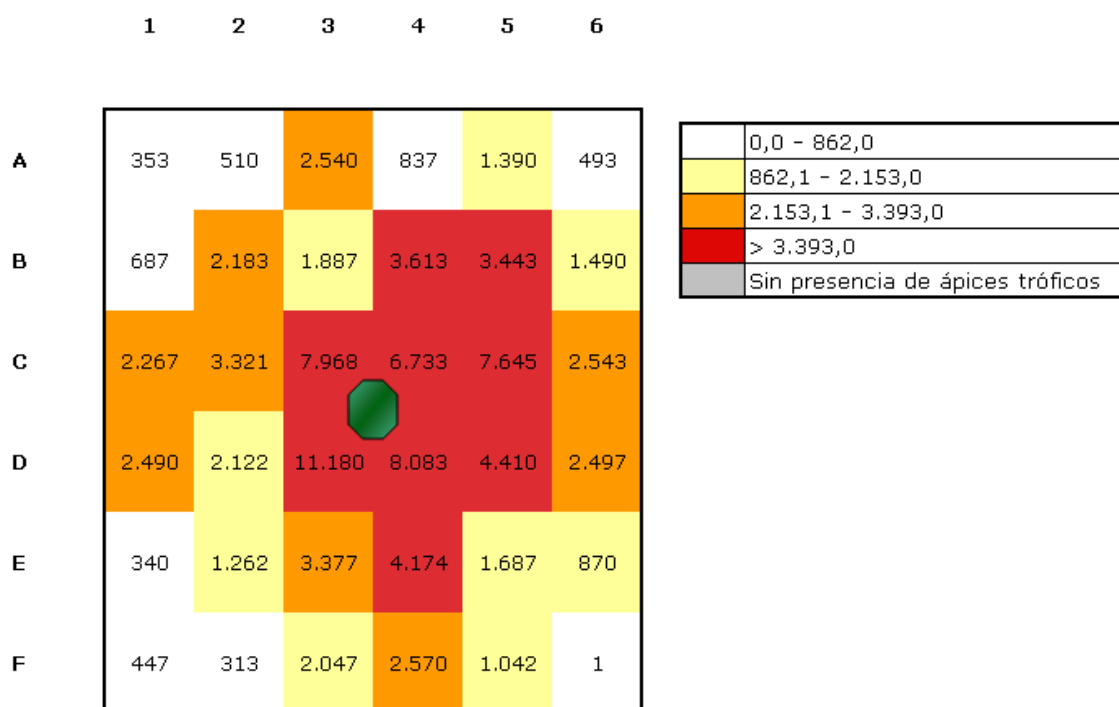


Figura 2. Distribución de los ápices tróficos alrededor de los avellanos.

### Micorrizas totales

La mayor parte de las micorrizas se encuentra en el volumen de suelo correspondiente a los cuatro cuadrantes más próximos al árbol, con 12.942 ápices. En los siguientes sectores, este número va disminuyendo, constando en los veinte cuadrantes exteriores de sólo un 17% de las micorrizas totales. Cabe destacar el alto valor encontrado en el cuadrante A3. El valor promedio total de micorrizas es de 25.787 (Figura 3).

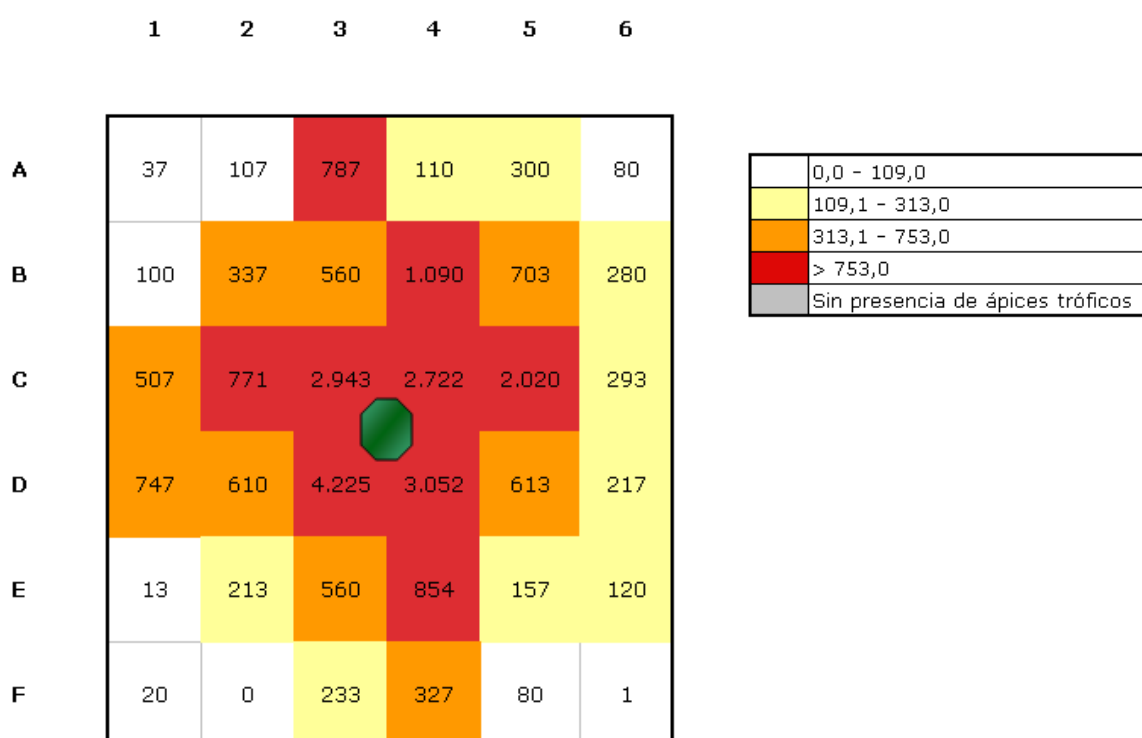


Figura 3. Distribución de las micorrizas totales alrededor de los avellanos.

### Micorrizas de *T. melanosporum*

*T. melanosporum* presenta una colonización en el promedio de los avellanos de 20.301 ápices por árbol. Se concentran principalmente en los cuatro primeros cuadrantes alrededor del árbol, con un 62% del total de los ápices de *T. melanosporum*. Los siguientes doce cuadrantes tienen el 31% de los ápices, tomando en los extremos valores que suponen el 7% (Figura 4).

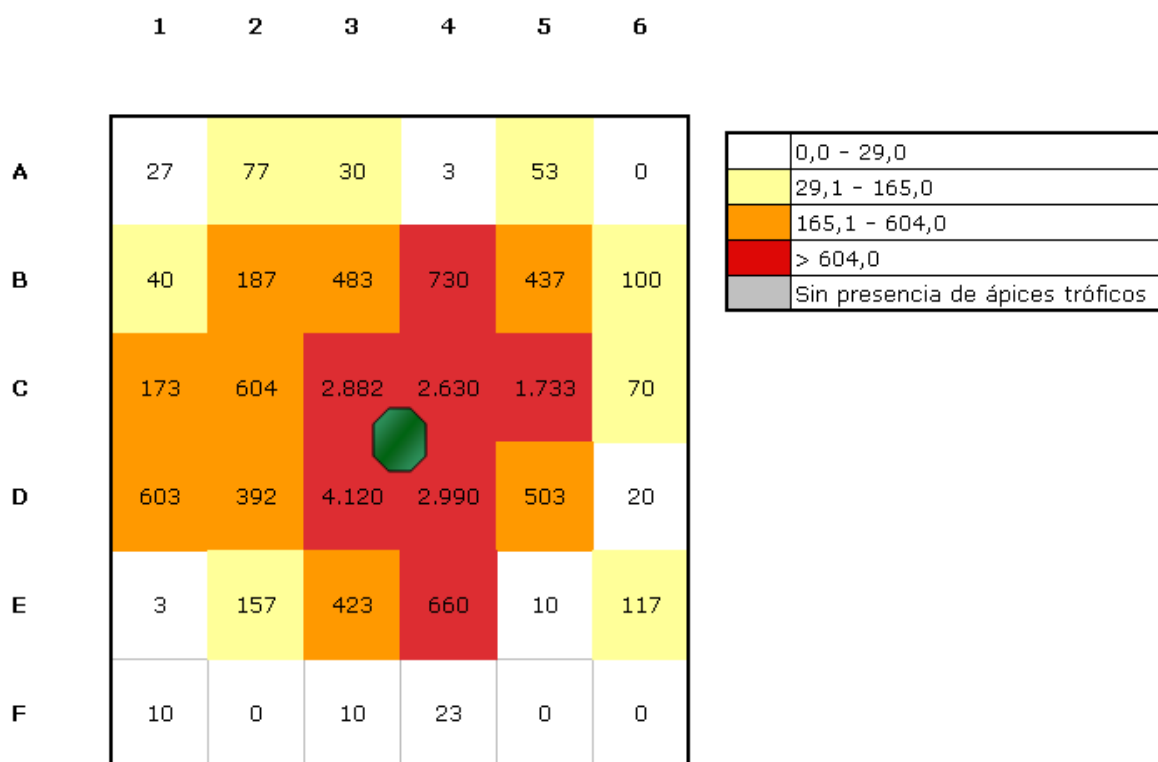


Figura 4. Distribución de las micorrizas de *T. melanosporum* alrededor de los avellanos.

### Ápices colonizados por hongos diferentes a *T. melanosporum*

La colonización de los ápices tróficos por parte de otros hongos ectomicorrícicos toma un valor promedio de 5.487 ápices por árbol. Se observa una clara tendencia hacia el extremo nordeste del espacio muestreado, tomando en este caso los valores más altos de micorrizas en los veinte cuadrantes exteriores, con 2.998 ápices; y los más bajos en el centro, con tan sólo 320 (Figura 5).

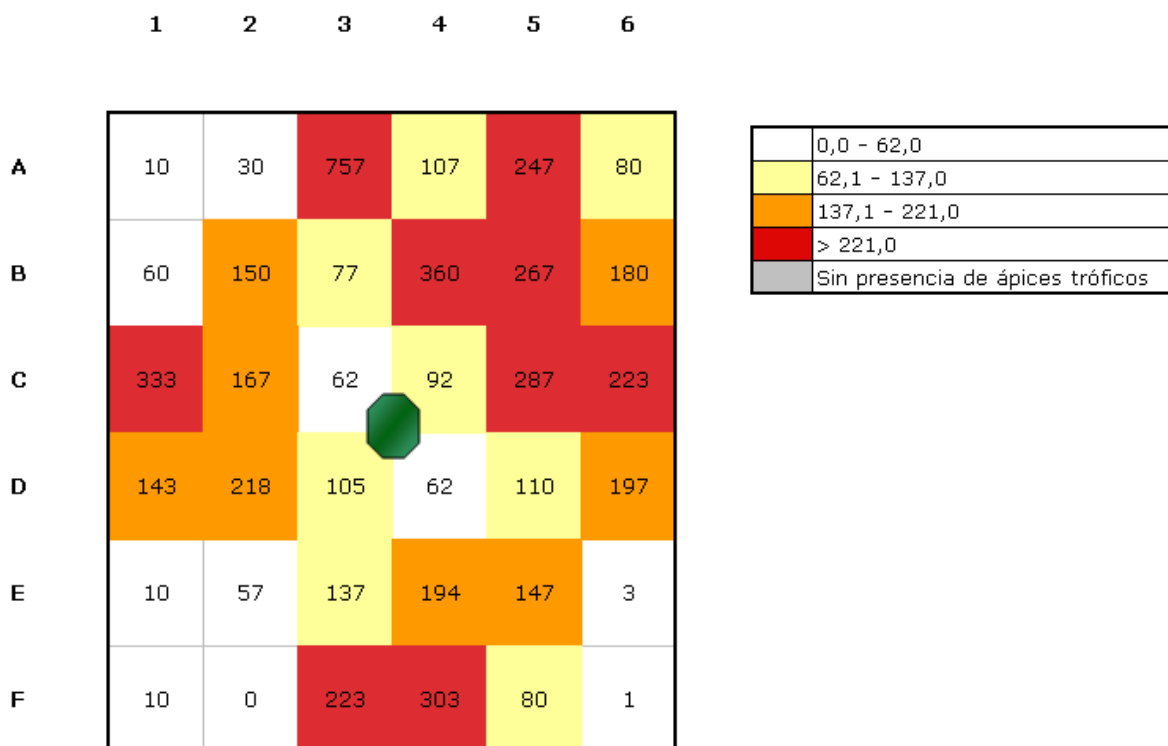


Figura 5. Distribución de los ápices tróficos colonizados por hongos ectomicorrícicos diferentes a *T. melanosporum* alrededor de los avellanos.

### Ápices sin micorrizas

Los ápices tróficos libres de micorrizas suman un valor promedio de 73.027. Los valores más altos se encuentran en el centro, con un total de 21.023 ápices; y en el siguiente sector, con 30.635. Los ápices que aparecen en el último sector constituyen un 30% de los ápices sin micorrizas (Figura 6).

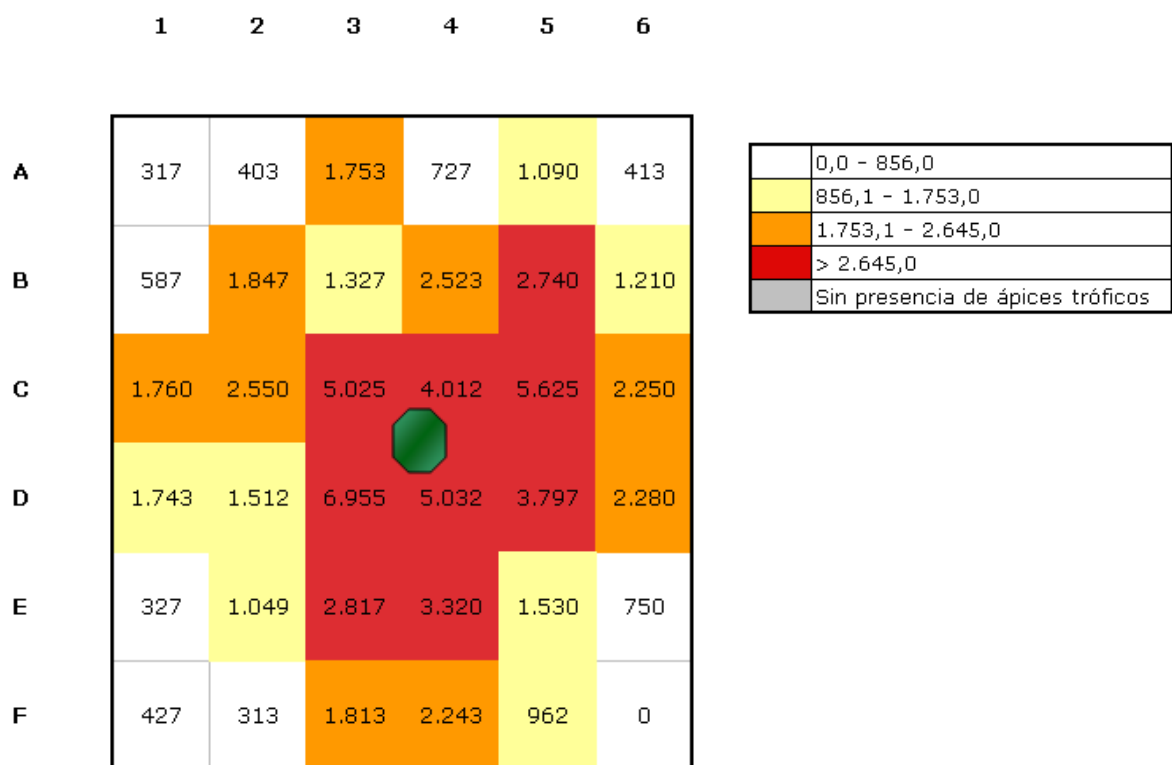


Figura 6. Distribución de los ápices tróficos no micorrizados alrededor de los avellanos.

### Abundancia relativa de *T. melanosporum*

El porcentaje de *T. melanosporum* respecto al total de micorrizas toma valores muy altos, rondando casi el 100% en los cuatro primeros cuadrantes. En el siguiente sector los valores son menos uniformes pero continúan siendo altos, superando el 50%, excepto en el cuadrante E5, con valores muy inferiores al resto. En el sector exterior los valores disminuyen: sólo alcanzan la proporción de 50% siete de los veinte cuadrantes. Destaca el alto porcentaje que muestra el E6. Cabe resaltar que se encontraron micorrizas de *T. melanosporum* en 32 de los 35 cuadrantes en los que había micorrizas, lo que supone una frecuencia de aparición del 91% (Figura 7).

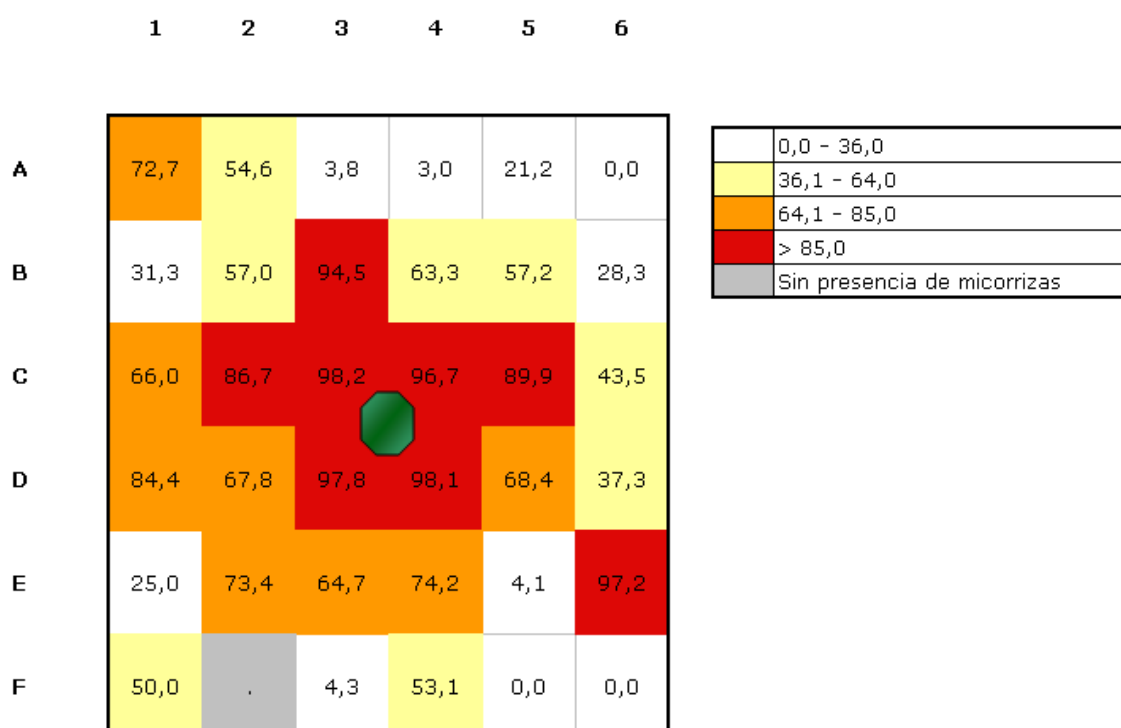


Figura 7. Abundancia relativa de *T. melanosporum* en avellanos.



### Abundancia relativa de ectomicorrizas

El porcentaje de micorrizas respecto al total de ápices toma valores altos, entre 35 y 40%, en los cuatro cuadrantes que rodean al árbol. En el siguiente sector los valores disminuyen, destacando dos cuadrantes que rondan valores del 30%. En los datos del último sector sobresalen cuatro cuadrantes que están por encima de un tercio del porcentaje total, y uno de ellos, el F6, que tiene una cantidad de ápices con micorrizas respecto a los ápices totales del 100%. Se observa una tendencia hacia el norte, con valores superiores a los de la parte sur (Figura 8).

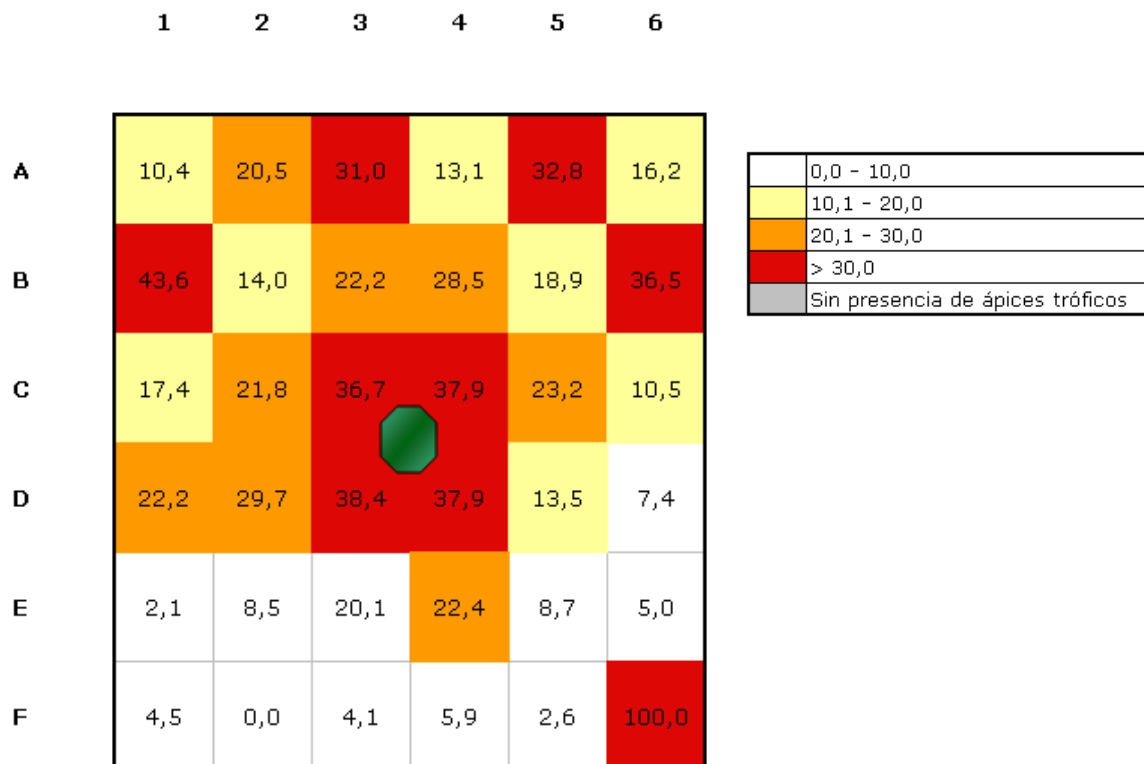


Figura 8. Abundancia relativa de ectomicorrizas en avellanos.

### 4.3. Distribución en encinas

#### Ápices tróficos totales

Los ápices tróficos totales presentan una media por árbol de 3.504. La distribución de los ápices alrededor del tronco del árbol aparece en la Figura 9. La mayor densidad de ápices tróficos se encuentra en los cuatro cuadrantes alrededor del tronco, con un valor medio total de 2.537 ápices por unidad de volumen. Los doce cuadrantes del siguiente sector presentan una media de 841, mientras que los veinte más alejados tan sólo suman 126. Únicamente se observaron ápices tróficos en el 66,7% del promedio de los cuadrantes.

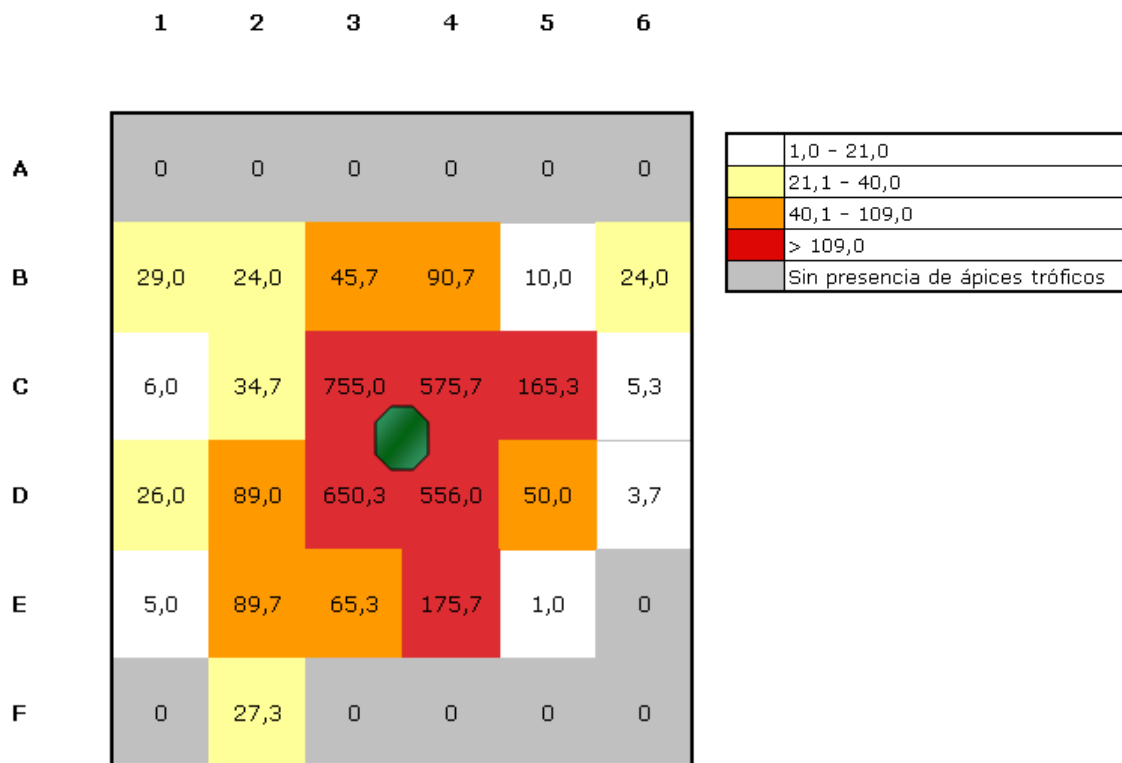


Figura 9. Distribución de los ápices tróficos alrededor de las encinas.

### Micorrizas totales

El estado de colonización de las raíces tróficas es más elevado alrededor del tronco. En los cuatro primeros cuadrantes hay un promedio de 624 micorrizas por árbol, mientras que en los doce siguientes el valor disminuye a 196. Las micorrizas totales observadas ascienden a 833. En los cuadrantes exteriores apenas se encontraron micorrizas, tal como se puede observar en la Figura 10.

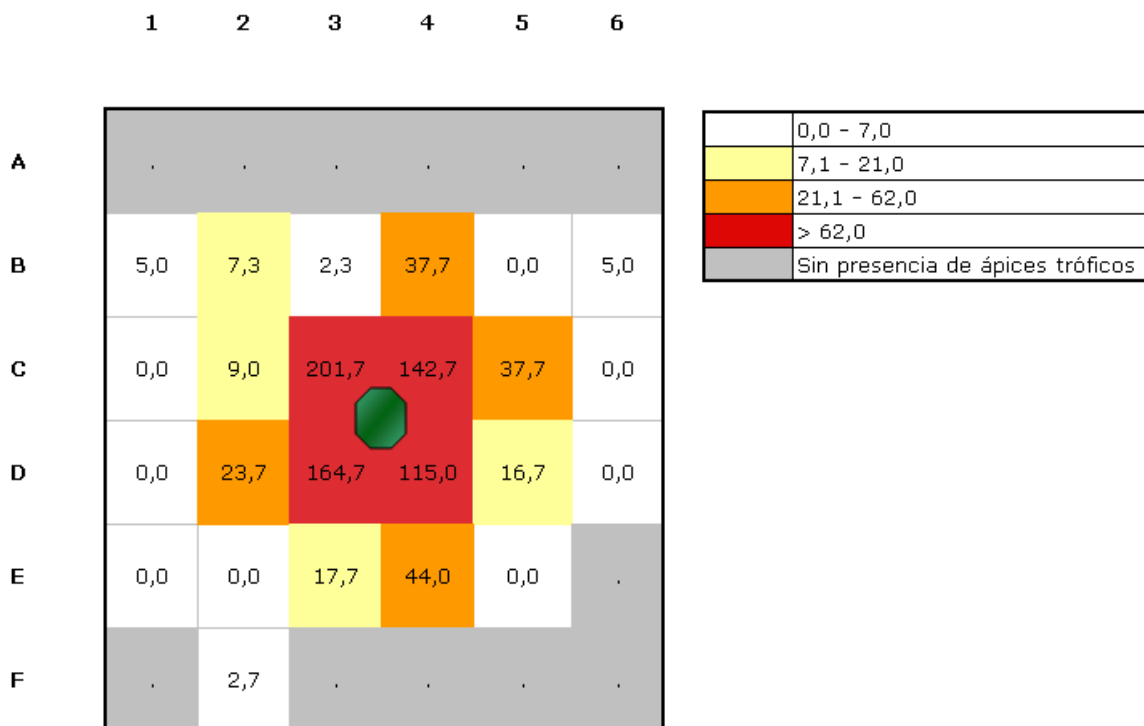


Figura 10. Distribución de las micorrizas totales alrededor de las encinas.

### Micorrizas de *T. melanosporum*

*T. melanosporum* presenta una escasa colonización en el promedio de las encinas, con un total de 222 unidades por árbol, concentradas en los cuatro primeros cuadrantes alrededor del tronco (Figura 11). Este bajo promedio se explica por la ausencia de *T. melanosporum* en dos de las tres encinas estudiadas.

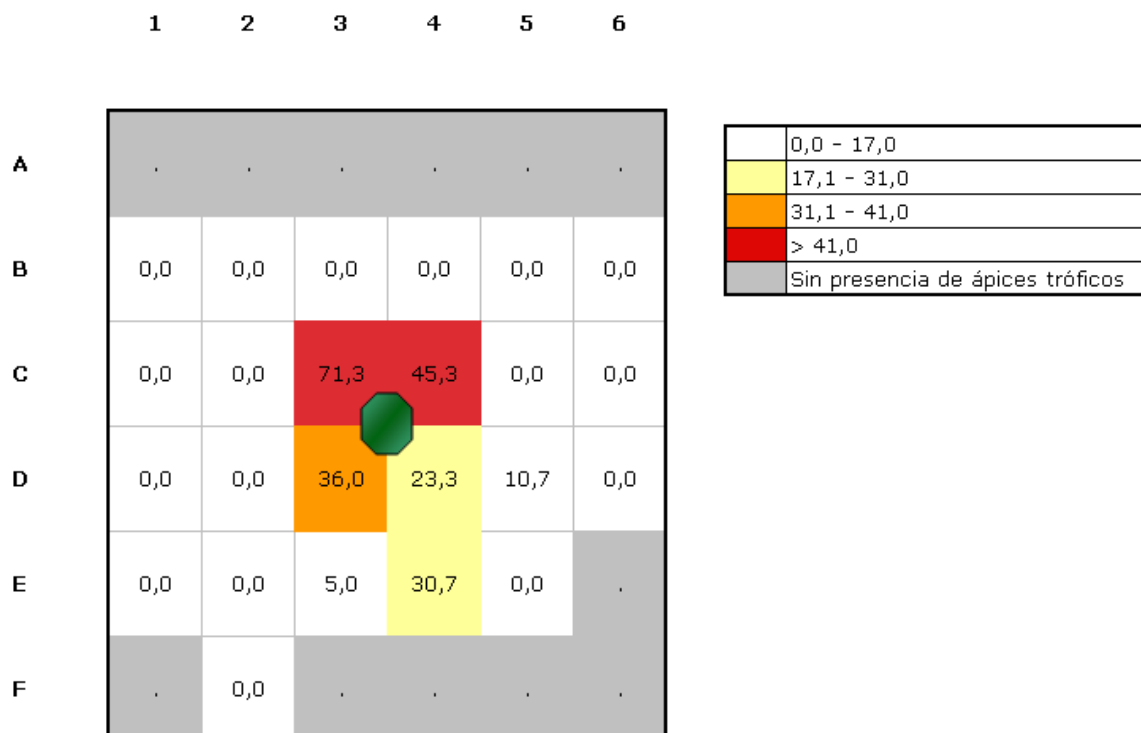


Figura 11. Distribución de las micorrizas de *T. melanosporum* alrededor de las encinas.

### Ápices colonizados por hongos diferentes a *T. melanosporum*

La colonización de los ápices tróficos por parte de otros hongos micorrícicos toma un valor promedio de 610 ápices por árbol. Tal como se puede observar en la Figura 12, esta colonización es bastante irregular más allá de los primeros 50 cm desde tronco, lo que se corresponde con los primeros cuatro cuadrantes.

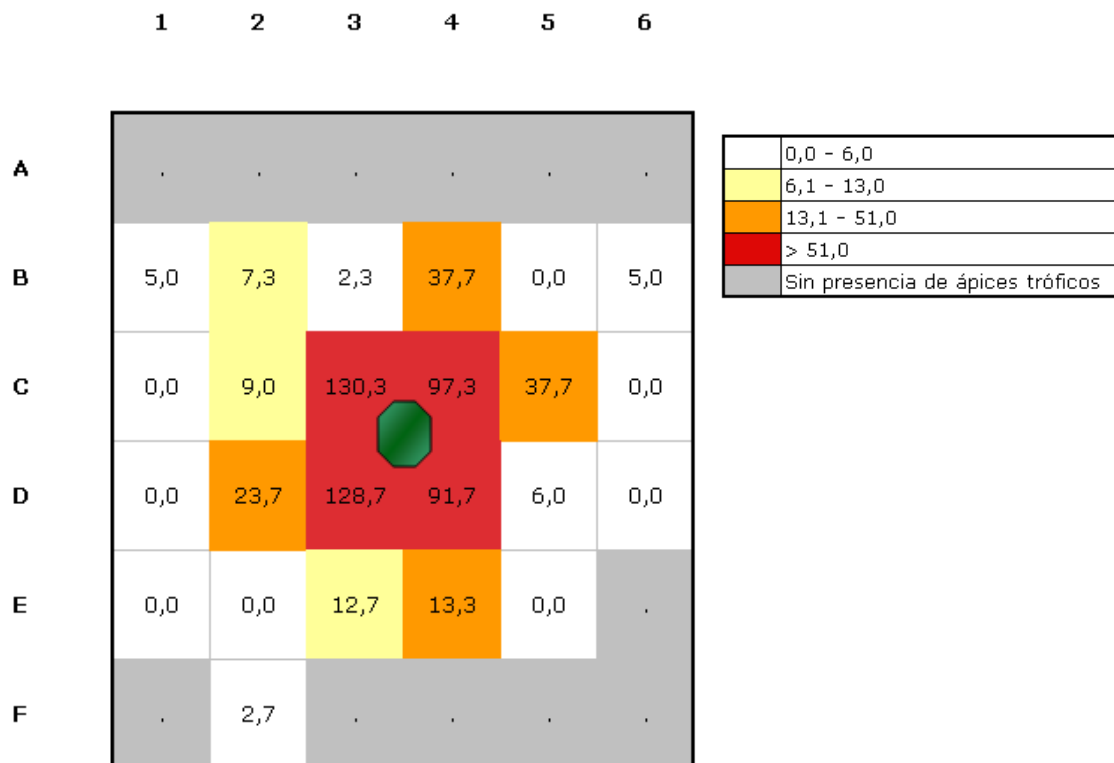


Figura 12. Distribución de los ápices tróficos colonizados por hongos ectomicorrícicos diferentes a *T. melanosporum* alrededor de las encinas.

### Ápices sin micorrizas

Los ápices tróficos sin presencia de micorrizas suman un valor promedio de 2.672, de los cuales 1.913 se encuentran dentro del volumen de suelo que comprenden los cuatro primeros cuadrantes que rodean el árbol. 645 ápices están en los doce cuadrantes situados entre medio metro y un metro respecto al tronco, y son solamente 114 los que se encuentran entre el metro y metro y medio (Figura 13).

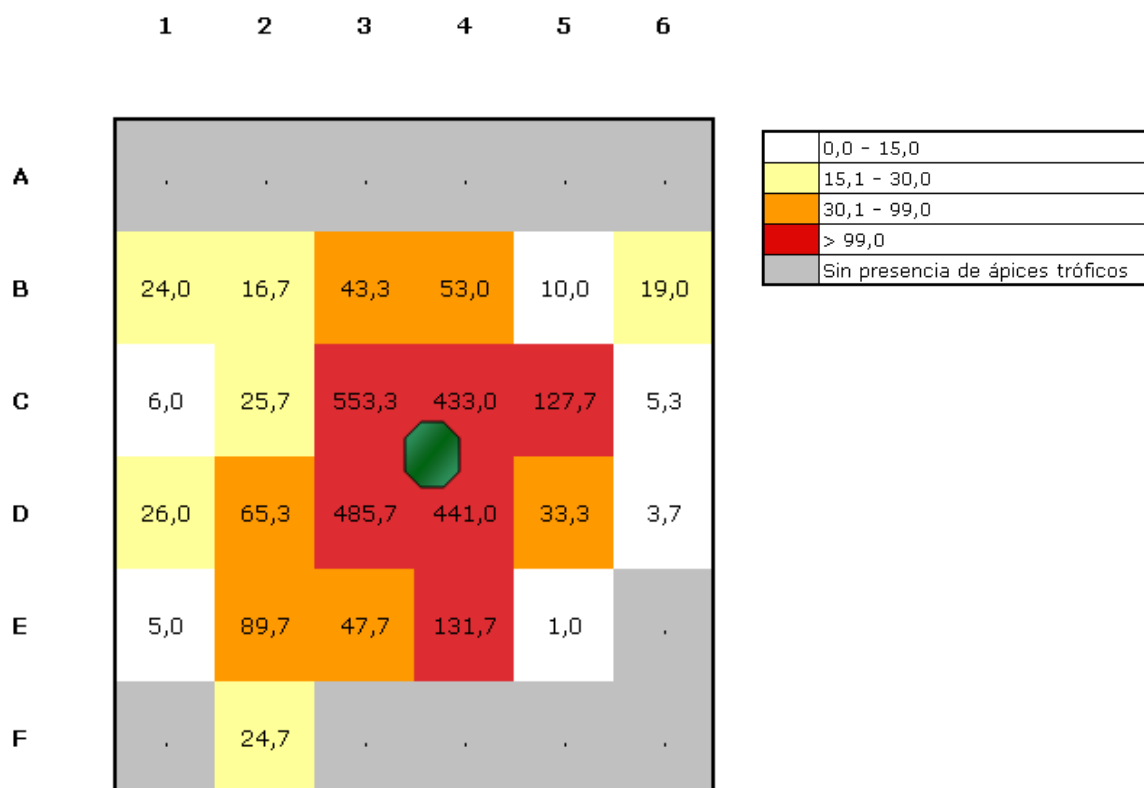


Figura 13. Distribución de los ápices tróficos no micorrizados alrededor de las encinas.

### Abundancia relativa de *T. melanosporum*

La presencia promedio de *T. melanosporum* respecto al total de micorrizas apenas llega a un tercio del total, excepto en los cuadrantes D5, E3 y E4, donde este valor aumenta considerablemente, llegando a ser casi mayoritaria (Figura 14). Es de destacar su desarrollo hacia la cara sur-este del árbol, aunque no se ha observado más allá de 1 metro del tronco. *T. melanosporum* sólo se encontró en un 20 % de los cuadrantes en los que aparecieron micorrizas.

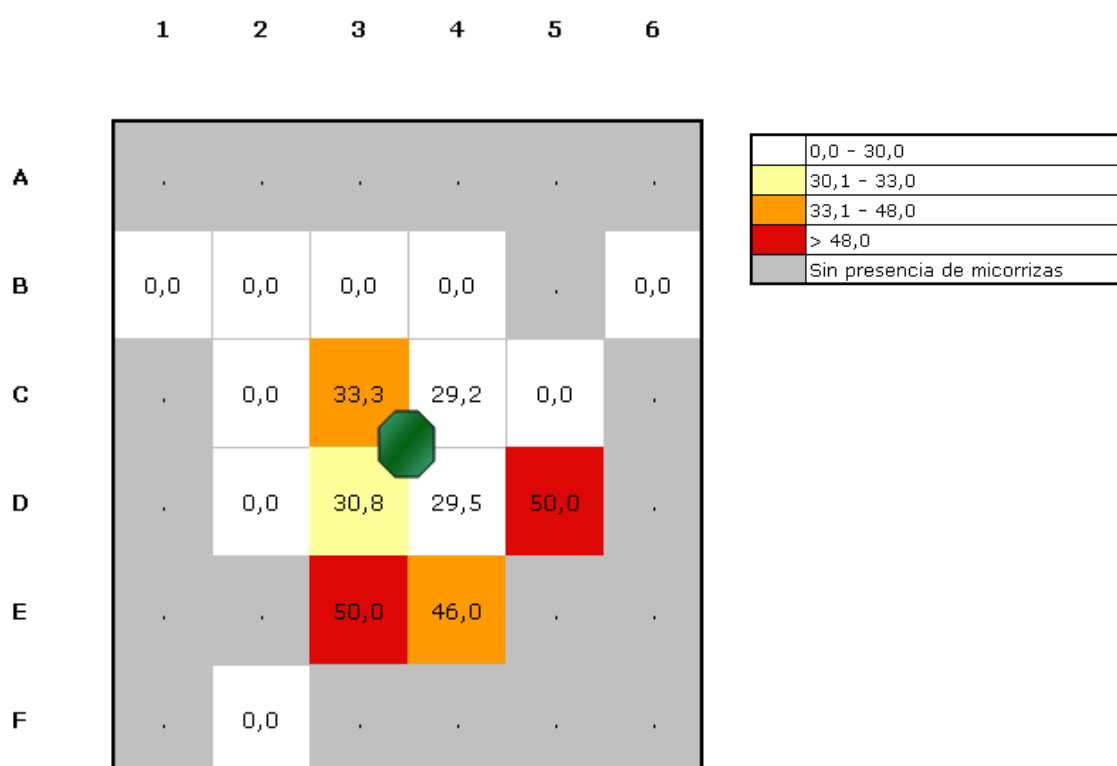


Figura 14. Abundancia relativa de *T. melanosporum* en encinas.

### Abundancia relativa de ectomicorrizas

La presencia promedio de micorrizas respecto al total de ápices toma los valores más altos en los alrededores del tronco, hasta una distancia de un metro de éste. De los veinte cuadrantes exteriores, únicamente se observaron micorrizas en tres: B1, B6 y F2 (Figura 15).

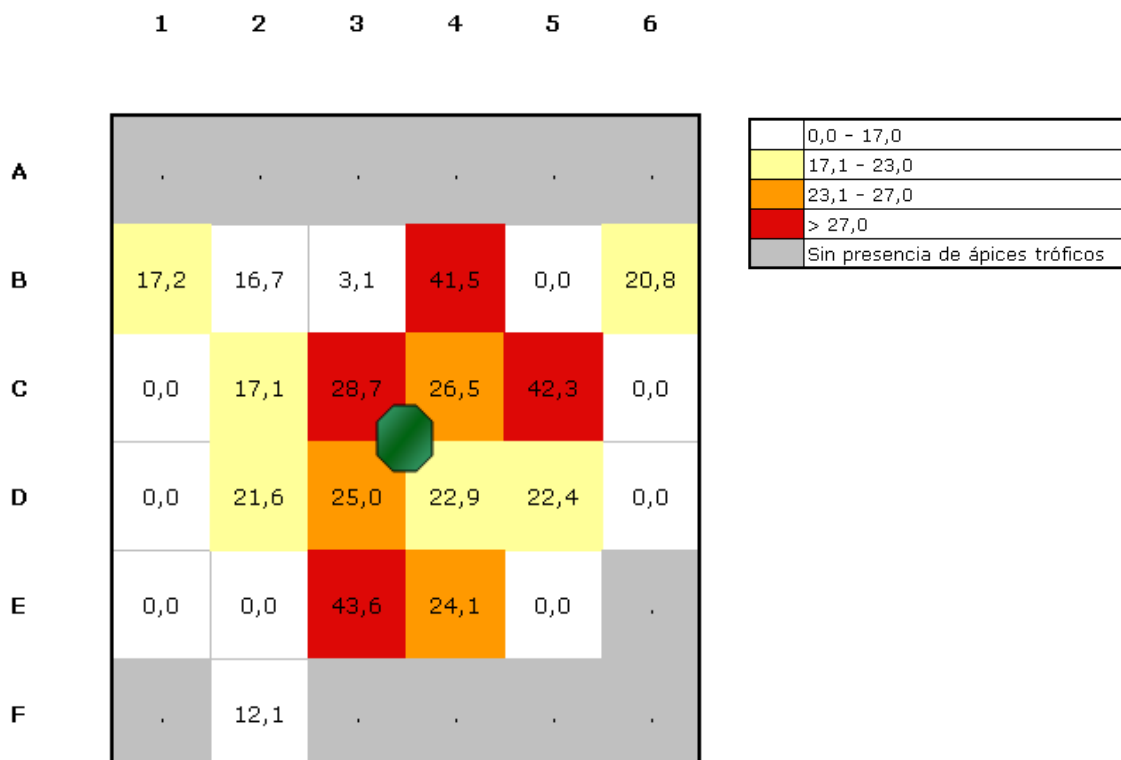


Figura 15. Abundancia relativa de ectomicorrizas en encinas.



#### 4.4. Distribución conjunta en encinas y avellanos

##### Abundancia relativa de *T. melanosporum*

El porcentaje de *T. melanosporum* respecto al total de micorrizas toma valores altos que superan el 40% en los dos primeros sectores, excepto el cuadrante E5. En el último sector los valores presentan más variabilidad, encontrando desde una proporción de micorrizas de *T. melanosporum* respecto a micorrizas totales del 0%, hasta otras que rondan el 70%, e incluso una de casi el 100% en el cuadrante E6 (Figura 16).

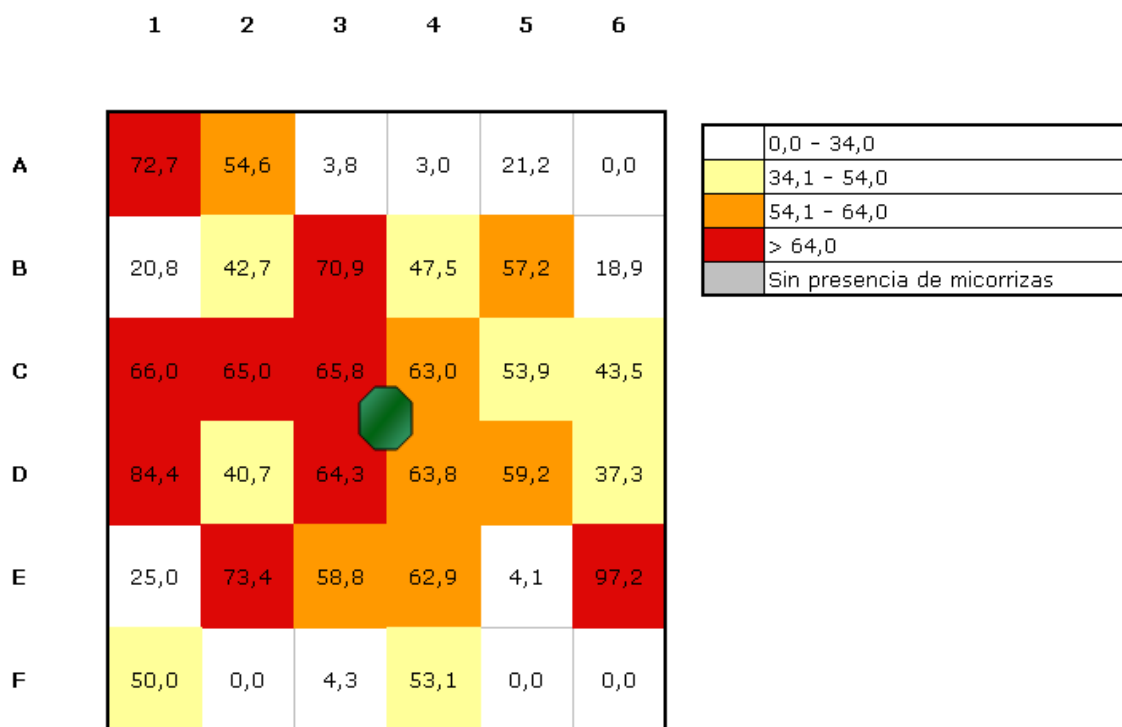


Figura 16. Abundancia relativa de *T. melanosporum*.

### Abundancia relativa de ectomicorrizas

El porcentaje entre micorrizas y ápices tróficos ronda el tercio de la colonización total, excepto en el cuadrante F6, donde este valor es del 100%. Los valores en el norte son superiores a los del sur; además se puede decir que existe una clara tendencia hacia el nordeste (Figura 17).

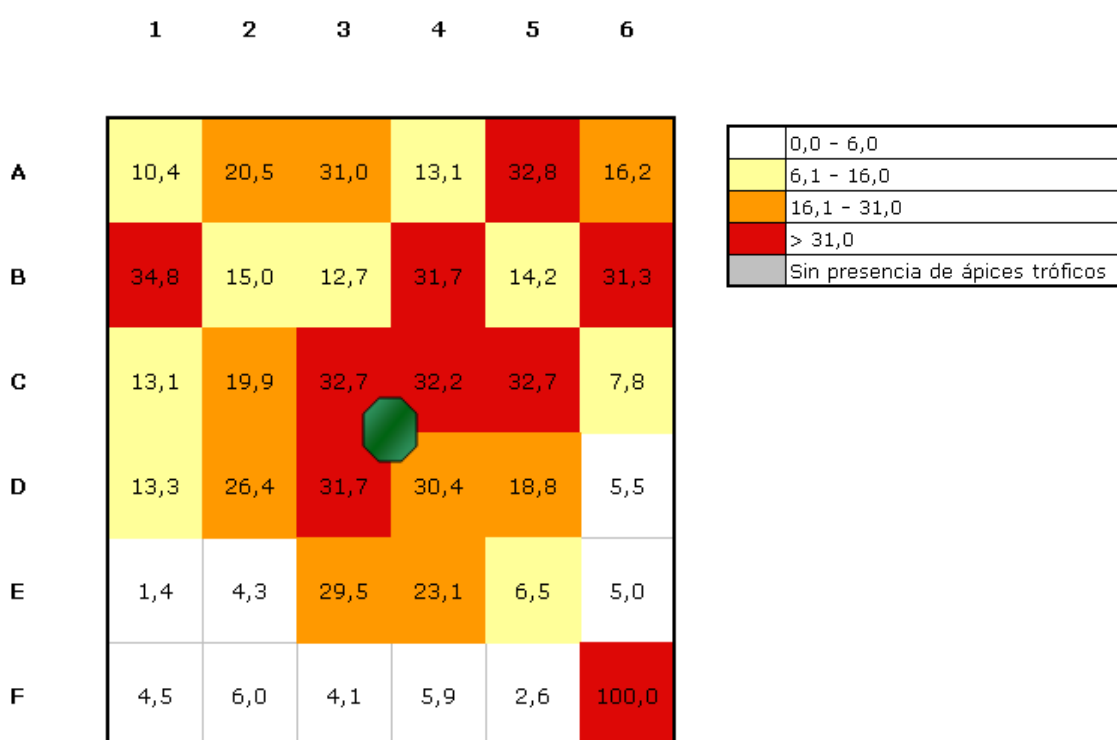


Figura 17. Abundancia relativa de ectomicorrizas.

#### 4.5. Correlaciones entre los distintos métodos de muestreo

##### Caso del primer metro cuadrado alrededor de la planta huésped

En la tabla 3 se muestran las correlaciones entre los distintos métodos de muestreo que se pretenden estudiar con la totalidad de la planta. En este caso, son los cuatro primeros cuadrantes, lo que equivale a una superficie muestreada de un metro cuadrado.

Tabla 3. Correlaciones entre los diferentes métodos de muestreo y el total observado para la abundancia relativa de *T. melanosporum* en una superficie de 1 m<sup>2</sup> alrededor de la planta huésped.

<b>Abundancia relativa de <i>T. melanosporum</i> (1 m<sup>2</sup>)</b>					
Método de muestreo	Coeficiente de correlación rho de Spearman	Media	Mediana	Desviación típica	Coef. de variación
Total	-	64,5	94,6	50,0	78
Cilindro (4) <sup>#</sup>	0,94 (0,003)*	48,6	45,7	53,3	110
Poliedro (1) <sup>#</sup>	0,75 (0,044) *	65,7	97,0	50,9	77
Raíces (2) <sup>#</sup>	0,99 (0,001)*	57,0	71,1	46,1	81
n=6					

n: indica el tamaño de la muestra.

#: Indica el número de submuestras de cada muestra

\*: Indica la significación para el coeficiente

En la columna “Coeficiente de correlación rho de Spearman” se muestra entre paréntesis la significación obtenida para cada correlación.

Como estamos ante una situación en la que no se puede suponer la normalidad de la distribución que se obtiene a partir de los datos; se presentan la media y desviación típica a modo informativo. También se muestran la mediana y el coeficiente de variación, para poder comparar desviaciones.

Se considera significativa una correlación con un valor máximo de riesgo del 10%, por lo que en este caso, en el que se compara el porcentaje de ápices de *T. melanosporum* con los ápices micorrizados totales, las tres correlaciones serán significativas. Los valores del Coeficiente rho de Spearman son muy altos, un 0,99 en el método de las raíces, que en esta ocasión serán dos submuestras, y 0,94 tomando muestras mediante cuatro cilindros. El poliedro toma un valor más bajo,

de 0,75, pero que puede seguir considerándose interesante.

En cuanto a los coeficientes de variación, todos los valores son muy altos, destacando el cilindro con 110.

Tabla 4. Correlaciones entre los diferentes métodos de muestreo y el total observado para la abundancia relativa de ectomicorrizas totales en una superficie de 1 m<sup>2</sup> alrededor de la planta huésped.

<b>Abundancia relativa de ectomicorrizas (1m<sup>2</sup>)</b>					
Método de muestreo	Coeficiente de correlación rho de Spearman	Media	Mediana	Desviación típica	Coef. de variación
Total	-	31,9	36,2	9,1	28,4
Cilindro (4) #	0,71 (0,036) *	19,4	6,5	22,3	114,9
Poliedro (1) #	0,48 (0,164) *	32,5	32,2	11,3	34,6
Raíces (2) #	0,26 (0,311) *	25,4	29,5	16,3	64,3
n=6					

n: indica el tamaño de la muestra.

#: Indica el número de submuestras de cada muestra

\*: Indica la significación para el coeficiente

Al realizar la correlación entre los diferentes métodos y el total en una superficie de un metro cuadrado, o lo que es lo mismo, los cuatro cuadrantes que rodean al tronco, se observa que la significación para la proporción de micorrizas respecto a ápices totales, solamente está por debajo del límite que se ha propuesto en unos de los métodos, los cilindros. En este caso el Coeficiente rho de Spearman toma un valor de 0,71.

Los otros dos métodos, poliedro y raíces (dos submuestras), además de no ser significativos, tienen coeficientes bajos comparados con el cilindro.

Y en cuanto al coeficiente de variación, es otra vez el cilindro quien toma los valores más desorbitados, en esta ocasión de 115.

### Caso de los primeros cuatro metros cuadrados alrededor de la planta huésped

Ahora se considera el total de la planta como los dieciséis cuadrantes más próximos al árbol, lo que es lo mismo, los dos primeros sectores, que suman una superficie muestreada de cuatro metros cuadrados. En esta ocasión se repite el muestreo dos veces para cada variable estudiada, una con una submuestra en el método del poliedro, y otra con dos submuestras.

Tabla 5. Correlaciones entre los diferentes métodos de muestreo y el total observado para la abundancia relativa de *T. melanosporum* en una superficie de 4 m<sup>2</sup> alrededor de la planta huésped. Caso de una única submuestra para el método del poliedro.

#### **Abundancia relativa de *T. melanosporum* (4 m<sup>2</sup>)**

Método de muestreo	Coefficiente de correlación rho de Spearman	Media	Mediana	Desviación típica	Coef. de variación
Total	-	60,2	84,9	46,9	77,9
Cilindro (12) <sup>#</sup>	0,65 (0,083) *	40,0	33,3	45,3	113,3
Poliedro (1) <sup>#</sup>	0,50 (0,333) *	61,3	86,9	53,4	87,1
Raíces (5) <sup>#</sup>	0,77 (0,038) *	59,1	78,2	46,7	79,0

n=6

n: indica el tamaño de la muestra.

#: Indica el número de submuestras de cada muestra

\*: Indica la significación para el coeficiente

En la abundancia relativa de *T. melanosporum* para una submuestra del poliedro, se obtiene significación en los cilindros, esta vez ampliado a doce submuestras; y en las raíces, con 5 submuestras. Estos valores están por debajo del 10% que se ha puesto como máximo, por lo que consideraremos los Coeficientes rho de Spearman para estos dos métodos. Vemos que es mayor el de las raíces, con un valor del 0,77, mientras que los cilindros sólo muestran un 0,65 de correlación.

Los coeficientes de variación continúan siendo muy altos, destacando otra vez los cilindros, con un valor de 113.

La misma cantidad de submuestras se comparan con el total de cuatro metros cuadrados, ahora para la abundancia relativa de ectomicorrizas.

Tabla 6. Correlaciones entre los diferentes métodos de muestreo y el total observado para la abundancia relativa de ectomicorrizas totales en una superficie de 4 m<sup>2</sup> alrededor de la planta huésped. Caso de una única submuestra para el método del poliedro.

**Abundancia relativa de ectomicorrizas (4 m<sup>2</sup>)**

Método de muestreo	Coeficiente de correlación rho de Spearman	Media	Mediana	Desviación típica	Coef. de variación
Total	-	26,8	27,9	5,6	20,9
Cilindro (12) <sup>#</sup>	0,66 (0,078)*	17,7	6,6	20,4	115,3
Poliedro (1) <sup>#</sup>	- **	30,9	33,0	15,9	51,5
Raíces (5) <sup>#</sup>	0,43 (0,198) *	25,6	28,3	16,2	63,3

n=6

n: indica el tamaño de la muestra.

#: Indica el número de submuestras de cada muestra

\*: Indica la significación para el coeficiente

\*\*Existen tres muestras sin datos lo que imposibilita el cálculo del coeficiente.

Se da el hecho de que en tres de las seis muestras de los poliedros cogidos al azar no se dispuso de datos, lo que significa que no había ápices tróficos, y no se pudo calcular la correlación en este método.

En cuanto a los cilindros, toman valores significativos, por lo que se puede hablar del coeficiente de correlación, de 0,66, que indica que no es demasiado alto en comparación con lo que nos habíamos encontrado hasta ahora. Sin embargo, en esta situación es el método más favorable.

Se siguen encontrando valores muy altos de coeficientes de variación, entre los que sobresalen los cilindros, con 115 % frente al 21 % del total muestreado. Éste último puede considerarse más aceptable.

En esta ocasión, viendo que los resultados obtenidos con sólo una submuestra en el método de los poliedros no han sido nada satisfactorios, se repiten las correlaciones con el total, incluyendo una submuestra más del mismo método.

Tabla 7. Correlaciones entre los diferentes métodos de muestreo y el total observado para la abundancia relativa de *T. melanosporum* en una superficie de 4 m<sup>2</sup> alrededor de la planta huésped. Caso de dos submuestras para el método del poliedro.

**Abundancia relativa de *T. melanosporum* (4 m<sup>2</sup>)**

Método de muestreo	Coeficiente de correlación rho de Spearman	Media	Mediana	Desviación típica	Coef. de variación
Total	-	60,2	84,9	46,9	77,9
Cilindro (12) #	0,65 (0,083) *	40,0	33,3	45,3	113,3
Poliedro (2) #	0,99 (0,001) *	62,3	86,8	53,4	85,7
Raíces (5) #	0,77 (0,038) *	59,1	78,2	46,7	79,0

n=6

n: indica el tamaño de la muestra.

#: Indica el número de submuestras de cada muestra

\*: Indica la significación para el coeficiente

Al incluir dos submuestras en el método de los poliedros, los resultados para la abundancia relativa de *T. melanosporum* cambian totalmente. Ahora el resultado es muy significativo, con una correlación casi perfecta, del 0,99. El coeficiente de variación disminuye, pero continúa teniendo valores muy elevados.

Se repite la misma ampliación de submuestras en los poliedros para la abundancia relativa de ectomicorrizas, ya que anteriormente no había podido calcularse por falta de datos.

Tabla 8. Correlaciones entre los diferentes métodos de muestreo y el total observado para la abundancia relativa de ectomicorrizas totales en una superficie de 4 m<sup>2</sup> alrededor de la planta huésped. Caso de dos submuestras para el método del poliedro.

**Abundancia relativa de ectomicorrizas (4 m<sup>2</sup>)**

Método de muestreo	Coeficiente de correlación rho de Spearman	Media	Mediana	Desviación típica	Coef. de variación
Total	-	26,8	27,9	5,6	20,9
Cilindro (12) #	0,66 (0,078) *	17,7	6,6	20,4	115,3
Poliedro (2) #	0,77 (0,036) *	23,8	28,3	15,7	66,0
Raíces (5) #	0,43 (0,198) *	25,6	28,3	16,2	63,3

n=6

n: indica el tamaño de la muestra.

#: Indica el número de submuestras de cada muestra

\*: Indica la significación para el coeficiente

Con dos submuestras de poliedros se obtienen valores significativos, por lo que se puede hablar del coeficiente de correlación, que da 0,77. Dentro de los dos métodos que dan significativos en este caso, el valor de correlación más alto es éste.

Es destacable observar que al añadir una submuestras en el método de los poliedros, el coeficiente de variación para los poliedros ha aumentado.

#### Caso de los 9 metros cuadrados totales alrededor de la planta huésped

Aumentamos la superficie hasta un total de nueve metros cuadrados, que equivale a los tres sectores en los que se ha dividido el área de muestreo, incluyendo todos los cuadrantes. En este caso sólo se considera el método de los poliedros ya que las raíces se recogieron en el primer y segundo sector, al igual que los cilindros.

Tabla 9. Correlaciones entre el método del poliedro al azar y el total observado para la abundancia relativa de ectomicorrizas de *T. melanosporum* en una superficie de 9 m<sup>2</sup> alrededor de la planta huésped.

<b>Abundancia relativa de <i>T. melanosporum</i> (9 m<sup>2</sup>)</b>					
Método de muestreo	Coeficiente de correlación rho de Spearman	Media	Mediana	Desviación típica	Coef. de variación
Total	-	56,6	74,4	44,9	79,3
Poliedro (2) <sup>#</sup>	0,93 (0,04) *	62,2	86,5	48,6	78,1
n=6					

n: indica el tamaño de la muestra.

#: Indica el número de submuestras de cada muestra

\*: Indica la significación para el coeficiente

Se toman dos submuestras en el método de los poliedros para correlacionar los resultados que se obtienen con este método y con el total. Se observa que la significación tiene un valor por debajo del 10 %, por lo que se puede acudir al coeficiente rho de Spearman. Éste es del 0,93, así que se considera aceptable.

Los coeficientes de variación son altos, tanto para el total ,79,3; como para los poliedros, 78,1.



Tabla 10. Correlaciones entre el método del poliedro al azar y el total observado para la abundancia relativa de ectomicorrizas totales en una superficie de 9 m<sup>2</sup> alrededor de la planta huésped.

**Abundancia relativa de ectomicorrizas (9m<sup>2</sup>)**

Método de muestreo	Coeficiente de correlación rho de Spearman	Media	Mediana	Desviación típica	Coef. de variación
Total	-	25,3	24,2	5,5	21,7
Poliedro (2) <sup>#</sup> n=6	0,14 (0,394) *	20,3	22,7	11,5	56,7
n=6					

n: indica el tamaño de la muestra.

#: Indica el número de submuestras de cada muestra

\*: Indica la significación para el coeficiente

En el caso de la abundancia relativa de ectomicorrizas, el método de los poliedros no da significativo, por lo que no se puede hablar de correlación. Aún así, el valor es muy bajo.

Tras analizar los valores de correlación obtenidos para cada uno de los métodos de muestreo, se decidió construir un gráfico comparando el total muestreado de nueve metros cuadrados con el método de los poliedros, hasta encontrar cuál es el punto en el que no es necesario seguir tomando muestras para conseguir los datos más representativos de la abundancia de micorrizas. Por esto, se ha ido aumentando el número de poliedros de dos en dos, hasta alcanzar un punto en el que la correlación se hace más o menos constante. La significación de los datos puede verse en la Tabla 11.

Para la abundancia relativa de *T. melanosporum*, los resultados son siempre altamente significativos, con un coeficiente de correlación de 0,93 hasta los cuatro poliedros muestreados, y de 0,94 si se sigue aumentando el número.

Tabla 11. Correlaciones entre el método del poliedro al azar y el total observado para la abundancia relativa de ectomicorrizas de *T. melanosporum* y las ectomicorrizas totales en una superficie de 9 m<sup>2</sup> alrededor de la planta huésped en función del número creciente de submuestras.

Nº de poliedros	T. melanosporum		Ectomicorrizas totales	
	Coef. rho de Spearman	Significancia	Coef. rho de Spearman	Significancia
2	0,93	0,004	0,14	0,394
4	0,93	0,004	0,09	0,436
6	0,94	0,003	0,26	0,311
8	0,94	0,003	0,22	0,340
10	0,94	0,003	0,26	0,311
12	0,94	0,003	0,14	0,394
14	0,94	0,003	0,66	0,078
16	0,94	0,003	0,71	0,055
18	0,94	0,003	0,49	0,164
20	0,94	0,003	0,94	0,002
22	0,94	0,003	0,83	0,021
24	0,94	0,003	0,94	0,002

En la abundancia relativa de ectomicorrizas los valores tanto de correlación como de significancia son más heterogéneos. El primer dato con una significación por debajo del 10% se encuentra muestreando 14 poliedros al azar, con un coeficiente de 0,66. Si se sigue aumentando el número de poliedros se alcanzan valores más altos de correlación, hasta un 94%, con una significación muy baja.

En el Gráfico 1 se observa como la correlación se mantiene en un 93% mientras se muestrean hasta cuatro poliedros. Luego este coeficiente varía poco, tomando un valor muy próximo al anterior, de 94%, y se mantiene constante aunque se sigan aumentando las subunidades de muestreo.

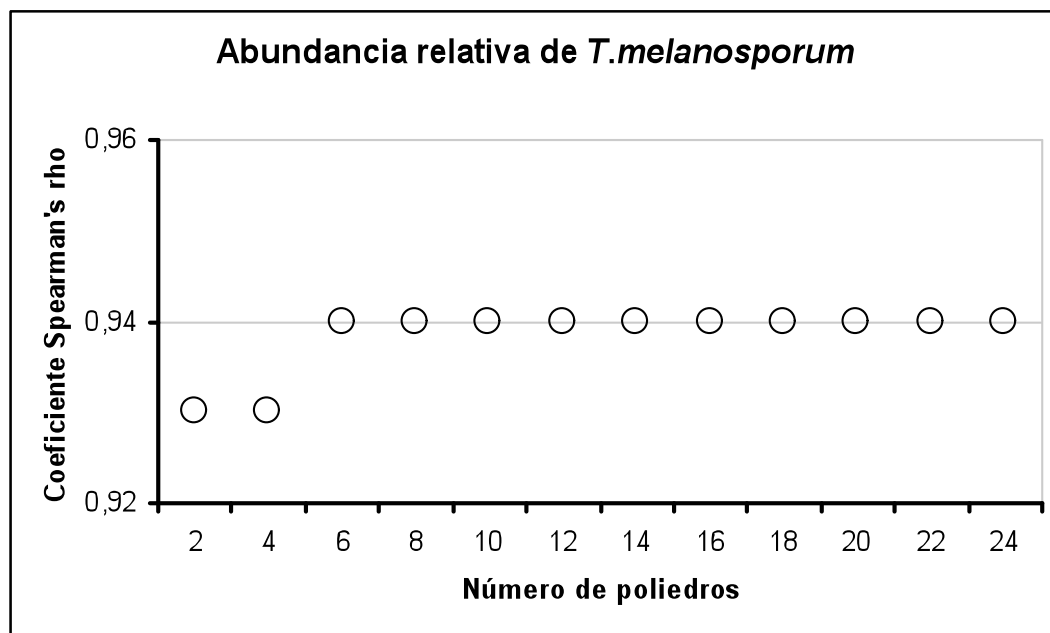


Gráfico 1. Correlaciones entre el método del poliedro al azar y el total observado para la abundancia relativa de ectomicorrizas de *T. melanosporum* en una superficie de 9 m<sup>2</sup> alrededor de la planta huésped en función del número creciente de submestras.

En el Gráfico 2, a medida que aumentan las submuestras, las correlaciones son menos constantes y menos esclarecedoras. Con ayuda de la Tabla 10, en la que se muestra la significancia para cada dato, se puede decir que se tendrá en cuenta el coeficiente de correlación a partir de las catorce submuestras.

Hay que destacar el extraño dato que se obtiene cuando se toman 18 poliedros como submuestras, pues la significancia está por encima del 10%, y el Coeficiente rho de Spearman baja bruscamente, aunque después se recupera.

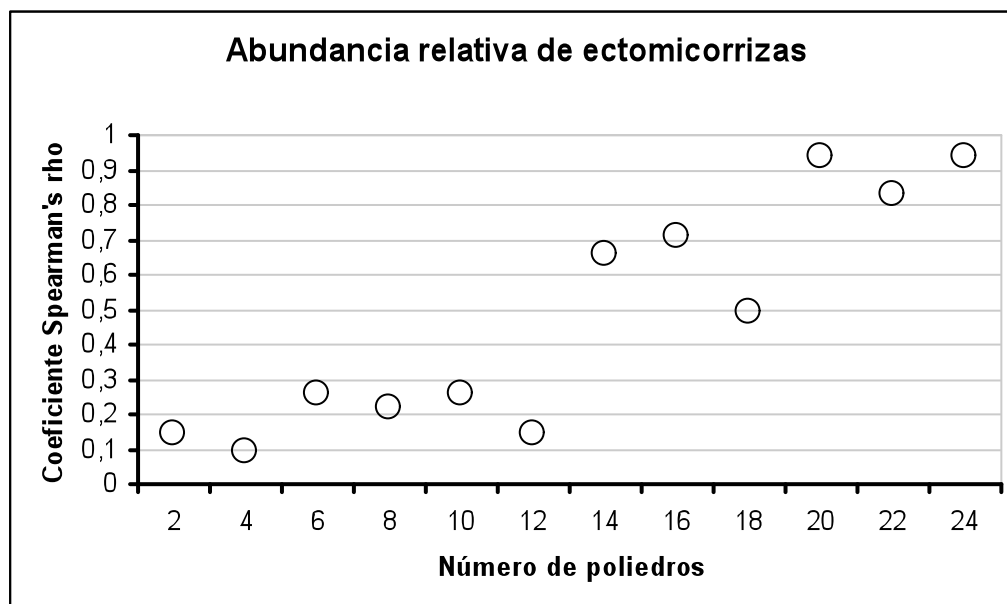


Gráfico 2. Correlaciones entre el método del poliedro al azar y el total observado para la abundancia relativa de ectomicorizas totales en una superficie de 9 m<sup>2</sup> alrededor de la planta huésped en función del número creciente de submuestras.

## 5. Discusión

### **5.1. La distribución de los ápices tróficos con y sin hongos alrededor del árbol**

El sistema radicular de los avellanos presentó una mayor cantidad de micorrizas y de suelo explorado que las encinas, aún teniendo la misma edad y estando sometidos al mismo tipo de gestión. En general, para las dos especies estudiadas, el mayor número de ápices tróficos se encontró en el primer metro cuadrado alrededor del tronco (Figuras 2 y 9).

Particularmente, el avellano se caracteriza por un sistema radicular carente de raíz pivotante, con gran cantidad de raíces superficiales y muy susceptible de que sean colonizadas por hongos ectomicorrícicos (Estrada, 1987; Reyna, 2007). En este estudio se observó que las micorrizas se extienden por toda la zona muestreada debido al crecimiento de la especie, pero la mayor densidad se encuentra en el centro, lo que se explicaría por ser el punto de partida para la expansión de *T. melanosporum* como consecuencia de la introducción del cepellón inoculado en el momento de realizarse la plantación (Figuras 3 y 4).

Según Chevalier *et al.* (1982), el avellano da grandes esperanzas por su pronta entrada en producción, debido a su alto crecimiento, pero recomienda frenar este fuerte desarrollo de la planta con un corte severo, de manera que la colonización por parte de *T. melanosporum* pueda seguir el crecimiento del sistema radicular, y las extremidades radiculares no corran el riesgo de ser contaminadas por propágulos no deseados. Hay que tener presente que cuando un ápice sin micorrizas llega a una porción de suelo donde se encuentra un propágulo de otro hongo, si éstos se reconocen y son compatibles, se da la colonización del ápice (Smith y Read, 1997). Los avellanos de este estudio no han

sido sometidos a ninguna poda, y, en principio, podríamos aceptar que la expansión radicular horizontal ha sido demasiado rápida respecto a la expansión de *T. melanosporum*, tal y como podemos observar en la Figura 5.

El crecimiento de la encina, con un sistema radicular pivotante cuya raíz principal, muy potente, no se ramifica horizontalmente hasta que su porte tiene un determinado tamaño, parece más acorde con el desarrollo de *T. melanosporum* (Reyna, 2007). Este comportamiento ha sido observado en el estudio. Así pues, en la distribución de ápices tróficos totales, se observa que éstos son escasos en los extremos muestreados, y la mayoría se encuentran próximos al tronco (Figura 9). Ocurre lo mismo con las micorrizas totales, en las que se dan valores altos en el centro pero muy bajos o incluso nulos en los extremos (Figura 10).

Respecto a los ápices colonizados por *T. melanosporum*, cabe destacar que son valores bastante bajos, debido a que en las figuras se presentan datos medios por especie, y dos de las tres encinas muestreadas carecían de ápices con este hongo. Este hecho ha resultado bastante sorprendente dado que el análisis del lote de los plantones antes de ser establecidos en el terreno mostraron porcentajes de *T. melanosporum* entre el 34% y el 53%, con ausencia de otro tipo de micorriza (Datos facilitados por el servicio de evaluación de planta del Área de Defensa del Bosque-CTFC). Sin embargo, en estas encinas sí que se observó, aunque no se cuantificó, la presencia de *T. aestivum*. Esta especie está muy presente en la zona de la parcela del estudio, comúnmente en los campos de avellanos colindantes.

Es interesante destacar los datos de abundancia relativa de *T. melanosporum*, donde observamos valores de cero en las partes más alejadas del tronco (Figura 14). Una posible interpretación podría ser que las plantas sin *T. melanosporum* presentaban más vigor y sus raíces fueron colonizadas por el inóculo presente en el suelo como se

ha sugerido en el caso del avellano. A pesar de que se ha observado que la colonización de *T. melanosporum* puede favorecer el crecimiento del huésped y su supervivencia (Domínguez Núñez *et al.*, 2006), también es cierto que las plantas con abundantes micorrizas de *T. melanosporum* padecen la desventaja de una menor conductancia hidráulica en su sistema radicular, lo cual debe ser compensado a base de realizar una mayor inversión en raíces tróficas para proporcionar suficiente aporte de agua a la planta (Nardini *et al.*, 2000). Las causas del escaso desarrollo de la encina con *T. melanosporum* y la presencia de *T. aestivum*, así como otros hongos ectomicorrícicos, van más allá de los objetivos planteados en este estudio. Además se deberían incluir un mayor número de unidades experimentales para plantear estos nuevos objetivos.

## **5.2. Los métodos de muestreo**

En una situación de uniformidad espacial, la probabilidad de detectar una especie determinada depende de la abundancia relativa en que se encuentra esta especie y del esfuerzo de muestreo, es decir, el número de muestras que tomamos (Taylor, 2002). Sin embargo, tal como se ha observado en los resultados de distribución real de *T. melanosporum*, existe una fuerte heterogeneidad espacial para la abundancia relativa de esta especie, patente en el coeficiente de variación, del 79%, en el conjunto de los nueve metros cuadrados alrededor del árbol (Tabla 9). Cuando nos aproximamos al árbol, el coeficiente de variación para esta variable se mantiene en el mismo rango de valores, 80% para los cuatro metros cuadrados y 78% para el primer metro cuadrado.

El interés en tomar muestras más o menos cerca del tronco del árbol estará en función de la edad de la plantación y del objetivo propuesto. La producción de trufa precoz se da en las proximidades del tronco. El muestreo en la zona de un metro cuadrado alrededor del árbol aportaría información de cómo está el hongo para empezar a producir. El muestreo más allá de este primer metro cuadrado debería permitir conocer cómo se desarrolla el hongo con el crecimiento y expansión

horizontal radicular.

#### Caso del muestreo en el primer metro cuadrado alrededor del árbol

En el primer metro cuadrado alrededor del árbol se tomaron como submuestras de los métodos de muestreo cuatro cilindros, un poliedro y dos raíces, ya que para la superficie muestreada, extraer más raíces podría suponer una excesiva destrucción del sistema radicular, y por lo tanto, un importante daño para el árbol.

En la abundancia relativa de *T. melanosporum* (Tabla 3), se obtienen coeficientes de correlación muy altos, tanto en la extracción de raíces, con 0,99; como en el método de los cilindros, 0,94. El coeficiente obtenido en los poliedros es más bajo, pero viendo los resultados que se recogen más adelante, no podemos decir que sea descartable. Así pues, se puede afirmar que en esta ocasión el método que da mejores resultados es la extracción de dos raíces.

En cuanto a la abundancia relativa de ectomicorrizas (Tabla 4), los resultados cambian. Ahora sólo el método de los cilindros es considerado por no ser significativos los otros dos, con un coeficiente de correlación de 0,71. Este valor es bajo frente al 0,99 obtenido en el caso anterior, pero aún así, es el método que presenta mejores resultados.

#### Caso del muestreo en los primeros cuatro metros cuadrados alrededor del árbol

Cuando pasamos al siguiente sector, con una superficie muestreada de cuatro metros cuadrados, se realizan las correlaciones con doce submuestras del cilindro, un poliedro y cinco raíces. Ahora la superficie muestreada es mayor, y parece razonable tomar más submuestras para poder representarla mejor. Viendo que los resultados obtenidos con una submuestra de tipo poliedro no eran esclarecedores, se decidió añadir una submuestra más.

Es importante destacar que la elección de las submuestras de poliedros se realizó totalmente al azar, por lo que se dio la situación de que en



tres de los seis árboles los poliedros elegidos no contenían datos. Esto hizo que no se pudiera realizar la correlación entre este método de muestreo y el total con un número de submuestras igual a uno. Por tanto, el hecho de la no presencia de ápices en alguna de las submuestras del estudio, puede influir notablemente en cuanto a la ausencia de resultados y la modificación del diseño experimental de muestreo. Experiencias llevadas a cabo por Kaldorf et al. (2004), indican que conforme aumenta la distancia al árbol, la semejanza de las comunidades de ectomicorrizas disminuye considerablemente, indicando una distribución espacial desigual de al menos algún morfotipo sobre el campo experimental.

La abundancia relativa de *T. melanosporum* con dos submuestras de poliedros tiene un coeficiente de correlación del 0,99 (Tabla 7). Las raíces toman un coeficiente de 0,77, mientras que los cilindros quedan desbancados. Por tanto, es obvio que el método más representativo en esta ocasión es tomar dos poliedros.

En cuanto a la abundancia relativa de ectomicorrizas (Tabla 8), las raíces ni siquiera son consideradas por no ser significativas. Los valores de cilindros y poliedros no son demasiado altos, pero destaca el método de los poliedros, con un coeficiente de 0,77.

#### Caso del muestreo en los primeros nueve metros cuadrados alrededor del árbol

En los nueve metros cuadrados totales, se realizan los coeficientes de correlación solamente para el método de los poliedros, con dos submuestras.

Los resultados en cuanto a abundancia relativa de *T. melanosporum*, muestran una correlación de 0,93 (Tabla 9), por lo que se considera que es una buena representación de la realidad.

En cambio, tomar dos poliedros para estimar la abundancia relativa de ectomicorrizas no es válido, pues el resultado ni siquiera llega a ser significativo (Tabla 10).

Merece la pena destacar, que la disparidad entre las dos variables explicativas, abundancia relativa de *T. melanosporum* y abundancia relativa de ectomicorrizas, puede ser debida a la mayor uniformidad en cuanto a *T. melanosporum*, ya que dos árboles estaban representados por dos ceros, esto es, tenían un mismo valor. Viendo estos últimos resultados, se decidió construir un gráfico en el que se muestra la correlación existente entre el método de los poliedros con la realidad conforme se va aumentando el número de submuestras.

En esta experiencia, cuando se trata de la abundancia relativa de *T. melanosporum*, se obtienen resultados que indican que las correlaciones son significativas a partir de los dos poliedros (Tabla 11). En el Gráfico 1 se observa que con dos y cuatro poliedros las correlaciones con el total son altas, de 0,93. Si se intensifica el número de muestreos a seis poliedros, este coeficiente aumenta a 0,94 y se mantiene constante a pesar de seguir añadiendo submuestras. Por tanto, como se tienen valores altos en ambos casos, se podrá tomar como bueno el resultado que se considere, dependiendo de la precisión que se desee, y valorando si un aumento de la correlación del 0,01 responde al esfuerzo que hay que realizar por aumentar las submuestras.

Al fijarse en la abundancia relativa de ectomicorrizas, se observa que la variabilidad es muy grande. Las significaciones no se hacen lo suficientemente pequeñas para que sean consideradas hasta las catorce submuestras (Tabla 11), y se encuentra un valor anómalo de éstas en las dieciocho submuestras. Esto puede deberse a la elección totalmente al azar de los poliedros. Así pues, viendo el Gráfico 2, y analizando las correlaciones a partir de las catorce submuestras (exceptuando las dieciocho), se debe valorar la aproximación que se desee y el esfuerzo necesario para ésta.

El diseño de estrategias o métodos de muestreo que aporten información representativa de la comunidad ectomicorrícica requiere conocer cuál es la distribución en el espacio de estas especies (Horton

y Bruns, 2001). Este estudio se realizó en una parcela donde se esperaba que la presencia de otras especies ectomicorrícicas fuera poco frecuente, ya que antes de realizar la plantación, dicha parcela se mantuvo durante varios años sin especies leñosas ectomicorrícicas. Así pues, se podía esperar que *T. melanosporum* estuviera distribuida uniformemente alrededor del árbol. Sin embargo, los datos obtenidos muestran cambios bruscos de abundancia, tanto relativa como absoluta, a lo largo del espacio y especialmente en las zonas más alejadas del tronco del árbol.

Si bien una parte de la variabilidad espacial de *T. melanosporum* se podría atribuir al propio crecimiento radicular de encina y avellano, marcado por las condiciones de heterogeneidad del suelo, no se puede descartar la hipótesis de la existencia de fuentes de inóculo de otras especies micorrícicas en el suelo que compitieran por los nuevos ápices que los árboles van creando. A pesar de que la introducción de *T. melanosporum* ejerce una fuerte competencia inicial con los hongos presentes en el suelo (Domínguez Nuñez *et al.*, 2005), la presencia de micorrizas de este hongo no excluye la contaminación por parte de otros hongos del sistema radicular (Chevalier *et al.*, 1982), de manera que conforme el árbol se va desarrollando y las raíces se van expandiendo, la cantidad de especies competidoras aumenta, pudiendo llegar a desplazar a la especie deseada e inhibir la fructificación de la trufa en este caso (De Miguel y Sáez, 1997; Giraud, 1983); o incluso eliminarla totalmente en la siguiente generación de micorrizas (Guidot *et al.*, 2003).

Así pues, estos métodos de muestreo para obtener información sobre la evolución de una determinada especie ectomicorrícica deberán contemplar la presencia de otros hongos ectomicorrícicos y su variabilidad en el espacio, aún cuando se esté en plantaciones donde únicamente se haya introducido voluntariamente una sola especie ectomicorrícica.

## 6. Conclusiones

Considerando un metro cuadrado alrededor del árbol, los resultados más representativos se obtienen con el método de las raíces para la abundancia relativa de *T. melanosporum*; y con los cilindros para la abundancia relativa de ectomicorrizas.

En los cuatro metros cuadrados, las correlaciones más altas con el total se dan en los poliedros tanto para la abundancia relativa de *T. melanosporum* como para la abundancia relativa de ectomicorrizas.

Tomando los nueve metros cuadrados totales, los valores más próximos a la población se dan, para la abundancia relativa de *T. melanosporum*, valorando el esfuerzo y la precisión requeridas, entre los dos y los seis poliedros; y para la abundancia relativa de ectomicorrizas, con un gran esfuerzo y teniendo en cuenta en todo momento la aproximación que se desea, a partir de las catorce submuestras por árbol.

## ***Agradecimientos***

A Carlos Colinas, por haber tutorado este proyecto.

A Antoni Olivera, por todo lo que me ha ayudado.

A Christine Fischer, por enseñarme las micorrizas.

A Aniol, Pau e Irantzu, por acompañarme a picar.

Al resto de compañeros del Laboratorio de Patología Forestal de la Universidad de Lleida, por aguantarme.

Al Centre Tecnològic Forestal de Catalunya por el soporte, tanto económico como de personal, para la realización de este proyecto.

## 7. Bibliografía

- Agerer, R. 1986. Studies on ectomycorrhizae. II. Introducing remarks on characterization and identification. *Mycotaxon*, 26: 473-492.
- Allen, M.F.; Swenson, W.; Querejeta, J.I.; Egerton-Warburton, L.M.; Treseder, K.K. 2003. Ecology of mycorrhizae: A conceptual framework for complex interactions among plants and fungi. *Annual Review of Phytopathology*, 41: 271-303.
- Bonet, J. A.; Fischer, C. R.; Colinas, C. 2006. Cultivation of black truffle to promote reforestation and land-use stability. *Agronomy for Sustainable Development*, 26: 69-76.
- Bonet, J.A.; Fischer, C.R.; Colinas, C. 2001. Evolución mensual en campo de las ectomicorrizas de *Tuber melanosporum* Vitt. inoculadas en plantas de *Quercus ilex*. Montes para la sociedad del nuevo milenio. III Congreso Forestal Español. Ed. Junta de Andalucía. Granada.
- Brundrett, M.; Bougher, N.; Dell, B.; Grove, T.; Malajczuk, N. 1996. Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. Australian Center for International Agricultural Research.
- Campbell, M.J.; Machin, D.; and Walters, S.J.; 2007, Medical Statistics: A Textbook for the Health Sciences: West Sussex, John Wiley & Sons Ltd, 344 pp.
- Chevalier, G.; Giraud, M.; Bardet, M.Ch. 1982. Interactions between mycorrhizae formed by *Tuber melanosporum* and by other ectomycorrhizal fungi in soils favourable to truffle fungi. In, Gianinazzi, S., Gianinazzi-Pearson, V., & Trouvelot, A. (eds.). Mycorrhizae, an integral part of plants: biology and perspectives for their use. Ed. INRA Publ. Colloq. INRA 13: 313-321.

- Colinas, C.; Capdevilla, J.M.; Oliach, D.; Fischer, C.R.; Bonet, J.A. 2007. Mapa de aptitud para el cultivo de la trufa negra (*Tuber melanosporum* Vitt.) en Cataluña. Solsona. Centre Tecnològic Forestal de Catalunya.
- De Miguel, A.M.; Sáez, R. 1997. Aspectos sobre truficultura en Navarra (España). Publicaciones de Biología, Universidad de Navarra, Serie Botánica, 10: 3-9.
- De Miguel, A. 2000. Biología de las trufas y las micorrizas. En "Jornadas de Truficultura. Viver, El Toro (Castellón). Reyna y Folch (coord.)".
- De Miguel, A.M.; Sáez, R. 2005. Algunas micorrizas competidoras de plantaciones truferas. Publicaciones de Biología, Universidad de Navarra, Serie Botánica, 16: 1-18.
- Domingo, M; Borau, J.A. 1998. Muntanyes de Prades: paisatge i fauna. Valls. Cossetània/Imatge-9,SL.
- Domínguez Núñez, J. A.; Serrano, J. S.; Rodríguez Barreal, J. A.; Saiz de Omeñaca, J. A. 2006. The influence of mycorrhization with *Tuber melanosporum* in the afforestation of a Mediterranean site with *Quercus ilex* and *Quercus faginea*. Forest Ecology and Management, 231: 226–233.
- Domínguez Núñez, J. A.; Rodríguez Barreal, J. A.; Saiz de Omeñaca, J. A. 2005. Ectomicorrizas en dos plantaciones truferas de encina (*Quercus ilex* L. subsp. *ballota* (Desf.) Samp.) en Castellón. Bol. Sag. Veg. Plagas, 31: 147-157
- Estrada, J. M. 1987. La trufa y la realidad de su cultivo. El cultivo racional de la trufa. El cultivador moderno, 809: 62-65.

- Fasolo-Bonfante P.; Fontana A.; Montacchini, F. 1971. Studi sull'ecologia del *Tuber melanosporum*. I. Dimostrazioni di un effecto fitotossico. Allionia, 17: 47-54.
- Frank, B. 2005. On the nutritional dependence of certain trees on root symbiosis with belowground fungi (an english translation of A.B. Frank's classic paper of 1885). Mycorrhiza, 15: 267-275.
- García-Montero, L. G.; Manjón, J. L.; Pascual, C.; García-Abril, A. 2007. Ecological patterns of *Tuber melanosporum* and different *Quercus* Mediterranean forests: Quantitative production of truffles, burn sizes and soil studies. Forest Ecology and Management, 242: 288–296
- Giraud, M. 1983. First results of analysis of mycorrhizae in situ. (Premiers resultats des analyses de mycorhizes in situ.) Bulletin FNPT 6: 23-32.
- Giraud, M. 1988. Prélèvement et analyse de mycorhizes. Bull. FNTP 10: 49-63. In "La truffe". CTIFL, Paris.
- Guidot, A.; Debaud, J.-C.; Effosse, A.; Marmeisse, R. 2003. Below-ground distribution and persistence of an ectomycorrhizal fungus. New Phytologist, 161: 539-547.
- Hernández, A.; Reyna, S.; Giner, M.; Folch, L.; Tagliaferro, F. 2001. Proyecto LIFE-Medio Ambiente. Revalorización de bosques productores de trufa: un ejemplo de gestión sostenible. III Congreso Forestal Español, Granada, 25-28 septiembre, Mesa 6, pp. 402-407.
- Horton, T.R.; Bruns, T.D. 2001. The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black-box. Molecular Ecology, 10(8): 1855-1871.



- Kaldorf, M.; Renker, C.; Fladung, M.; Buscot, F. 2004. Characterization and spatial distribution of ectomycorrhizas colonizing aspen clones released in an experimental field. *Mycorrhiza*, 14: 295-306.
- Kirk, P.M., Cannon, P.F., David, J.C., and Stalpers, J.A., 2001, Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi: Wallingford, CAB.
- Lilleskov, E.A.; Bruns, T.D.; Horton, T.R.; Taylor, D.; Grogan, P. 2004. Detection of forest stand-level spatial structure in ectomycorrhizal fungal communities. *FEMS Microbiology Ecology* v. 49: 319–332.
- Lledó, M.J.; Piñol, J. 1989. Balance hídrico de dos cuencas de encinar de la Serra de Prades (Tarragona). *Options Méditerranéennes, Série Séminaires*, 3: 227-231.
- Mamoun, M.; Olivier, J.M. 1990. Dynamics of fungal and bacterial populations of truffle-producing Hazelnut trees 3. Effect of the soil water content on mycorrhization and the associated microflora. *Agronomie*, 10: 77-84.
- Nardini, A.; Salleo, S.; Tyree, M.T.; Vertovec, M. 2000. Influence of the ectomycorrhizas formed by *Tuber melanosporum* Vitt. on hydraulic conductance and water relations of *Quercus ilex* L. seedlings. *Ann. For. Sci.*, 57: 305-312.
- Oliach, D.; Bonet, J. A.; Fischer, C. R.; Martínez de Aragón, J.; Colinas, C. 2008. El cultiu de la tòfona negra. Dossier tècnic, 26; 20p. Ed. Departament d'Agricultura, Alimentació i Acció Rural.
- Percudani, R.; Trevisi, A.; Zambonelli, A.; Ottonello, S. 1999. Molecular phylogeny of truffles (pezizales: Terfeziaceae, tuberaceae) derived from nuclear rDNA sequence analysis. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 13: 169-180.
- Reyna, S. 2007. Truficultura. Fundamentos y técnicas. Madrid. Mundi-Prensa.

- Smith, S. E.; Read, D. J. 1997. Mycorrhizal Symbiosis. Second Edition. Academic Press, Inc.; London, U.K.
- Taylor, A.F.S. 2002. Fungal diversity in ectomycorrhizal communities: sampling effort and species detection: Plant and Soil v. 244: 19–28.
- Tedersoo, L.; Koljalg, U.; Hallenberg, N.; Larsson, K.H. 2003. Fine scale distribution of ectomycorrhizal fungi and roots across substrate layers including coarse woody debris in a mixed forest. New Phytologist v. 159: 153–165
- Wallander, H.; Nilsson, L. O.; Hagerberg, D.; Baath, E. 2001. Estimation of the biomass and seasonal growth of external mycelium of ectomycorrhizal fungi in the field. New Phytologist, 151: 753-760.